

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Inhibición de la respuesta linfocitaria "in vitro" por factores
supresores presentes en el suero de gestantes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Clara Eugenia Roda Frade

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310043340

174

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA ANIMAL

INHIBICION DE LA RESPUESTA LINFOCITARIA "IN VITRO" POR
FACTORES SUPRESORES PRESENTES EN EL SUERO DE GESTANTES

Memoria, que para optar al grado de doctor,

presenta Clara Eugenia Roda Frade

Clara Eugenia Roda Frade

VºBº

Director Fernando Ortiz Masllorens

Jefe del Servicio de Inmunología

de la Fundación Jiménez Díaz



R. 28016

Madrid 1.984

A la memoria de mi padre Emiliano Roda
hombre de extraordinaria categoría humana y
científica

a mi marido

y

a mi madre

con todo mi amor

Esta Tesis Doctoral, ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Médicas de la Fundación Jimenez Díaz de Madrid, bajo la dirección del Dr. Fernando Ortiz Masllorens, subdirector de investigación y jefe del servicio de Inmunología y de la Dra. Maria Pilar Palomino Diaz, adjunto de dicho departamento.

Expreso mi más cálido agradecimiento a la Dra. Palomino, por sus apreciadas enseñanzas y acertados consejos, que han sido la base fundamental para la consolidación de esta investigación, así como su constante estímulo, entusiasmo y dedicación, sin los cuales no se hubiera concluido esta Tesis.

Al Dr. Ortiz dedico mi más profundo agradecimiento, por haberme brindado la oportunidad de acceder al mundo científico y manifestarle mi respeto y admiración por su contribución al mejor conocimiento de la Inmunología y por alentar un grupo interdisciplinario de trabajo, cuyos resultados están siendo de gran interés. Le agradezco sus valiosas orientaciones en el terreno profesional y su extraordinario sentido crítico, que han sido decisivos para este trabajo.

Así mismo a la Dra. Mercedes Alonso Bedate, catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, que me ha honrado aceptar la ponencia de esta Tesis.

A mis amigos y compañeros de trabajo, especialmente a Maria de Miguel Ortiz y Maria José Amengual Guedán, por su colaboración y aportaciones en la Ciencia inmunológica y porque supieron crear a mi alrededor un ambiente agradable para superar las dificultades que toda tarea de investigación conlleva.

A Miguel Angel de la Horra Mendez, por su estimada ayuda y apoyo moral, expreso toda mi gratitud.

Finalmente, quiero agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia y a la Fundación Jimenez Díaz, la concesión de las becas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

INDICE

Página

Agradecimientos	I
Abreviaturas	IX
1. INTRODUCCION	1
1.1. Sistema Inmune	2
1.1.1. Generalidades	2
1.1.2. Ontogénia y diferenciación de linfocitos	3
1.1.3. Línea linfocítica	3
1.1.4. Linfocitos T	6
1.1.4.1. Etapas de diferenciación	6
1.1.4.2. Marcadores de linfocitos T periféricos	11
1.1.4.3. Heterogeneidad funcional de linfocitos T	13
1.1.5. Linfocitos B	16
1.1.5.1. Generalidades	16
1.1.5.2. Ontogénia de linfocitos B	17
1.1.5.3. Etapas de diferenciación de linfocitos B	17
1.1.5.4. Ciclo vital de los linfocitos B	19
1.1.5.5. Marcadores de linfocitos B	19
1.1.6. Lectinas	21
1.2. Feto como aloinjerto	23
1.2.1. Introducción	23
1.2.2. Mecanismos de protección fetal	24
1.2.2.1. El útero es un lugar inmunológicamente privilegiado	24
1.2.2.2. Feto no inmunogénico	25
1.2.2.3. Inmunocompetencia inmunológica materna	27

1.2.2.4.	Tolerancia inmunológica de la madre para el feto	29
1.2.2.5.	Barrera anatómica placentaria	29
1.2.3.	Hormonas y proteínas asociadas al embarazo	31
1.2.3.1.	Esteroides	32
1.2.3.2.	Gonadotropina coriónica humana	32
1.2.3.3.	Lactógeno placentario humano	33
1.2.3.4.	Transcortina	34
1.2.3.5.	Transferrina	34
1.2.3.6.	Factor temprano del embarazo	34
1.2.3.7.	Beta ₁ glicoproteína específica del embarazo	34
1.2.3.8.	Alfa ₂ glicoproteína asociada al embarazo	35
1.2.3.9.	Beta ₁ macroglobulina asociada al embarazo	36
1.2.3.10.	Proteína A del plasma asociada al embarazo	36
1.2.3.11.	Inhibidor de prostaglandina sintetasa asociada al embarazo	36
1.2.3.12.	Ceruloplasmina	37
1.2.3.13.	Alfa ₁ glicoproteína ácida	37
1.3.	Alfa-fetoproteína (AFP)	38
1.3.1.	Generalidades	38
1.3.2.	Características fisico-químicas	38
1.3.3.	Síntesis y niveles de AFP	39
1.3.4.	Implicaciones clínicas de la AFP	43
1.3.5.	Características biológicas de la AFP	48
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	50
3.	MATERIALES Y METODOS	53
3.1.	Soluciones más utilizadas	54
3.2.	Aislamiento y purificación de AFP	56
3.2.1.	Cromatografía de intercambio iónico	56

3.2.2.	Filtración a través de Sephadex G-25	56
3.2.3.	Cromatografía de afinidad en Sepharosa Con A	57
3.2.4.	Inmunodifusión doble bidimensional	57
3.2.5.	Inmunoelectroforesis	58
3.2.6.	Obtención de alfa-globulinas humanas	59
3.2.7.	Obtención de anti-alfa globulinas humanas de conejo	59
3.2.8.	Columnas de inmunoabsorbente	60
3.2.8.1.	Preparación de inmunoabsorbentes	60
3.2.8.2.	Purificación de AFP	60
3.3.	Determinación de AFP por radioinmunoensayo	62
3.3.1.	Antisuero anti-AFP	62
3.3.2.	Discos de papel	62
3.3.3.	Acoplamiento de la proteína a los papeles	63
3.3.4.	Marcaje de la proteína con ^{125}I	63
3.3.5.	Técnica de radioinmunoanálisis	64
3.3.6.	Radioinmunoanálisis comercial de AFP	65
3.4.	Fraccionamiento del suero de mujeres embarazadas	67
3.4.1.	Suero de mujeres gestantes	67
3.4.2.	Suero de gestantes desprovisto de AFP	67
3.4.3.	Filtración a través de Sephadex G-200 superfino	67
3.4.4.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	68
3.4.4.1.	Tampones y soluciones	68
3.4.4.2.	Preparación del gel	69
3.4.4.3.	Preparación de las muestras y marcadores	70
3.4.4.4.	Desarrollo de la electroforesis	70
3.4.4.5.	Tinción y fijación	70
3.5.	Cultivo de células mononucleares "in vitro"	71

3.5.1.	Obtención de linfocitos humanos	71
3.5.2.	Viabilidad celular	72
3.5.3.	Preparación de hematíes de carnero	72
3.5.4.	Preparación de suero de ternera fetal adsorbido	72
3.5.5.	Formación de rosetas espontáneas	73
3.5.6.	Aislamiento de linfocitos T y poblaciones no T	73
3.5.7.	Inmunoglobulina de superficie	76
3.5.8.	Rendimiento de la técnica	76
3.5.9.	Preparación y desarrollo de los cultivos	78
3.5.9.1.	Cultivos de subpoblaciones linfocitarias en presencia de sueros de gestantes	78
3.5.9.2.	Cultivos de linfocitos T en presencia de AFP purificada	79
3.5.9.3.	Cultivos de linfocitos T en presencia de sueros de mujeres gestantes desprovistos de AFP	79
3.5.9.4.	Cultivos de linfocitos T en presencia de las fracciones 19S, 7S y 4S de suero de mujeres gestantes desprovisto de AFP	80
3.5.9.5.	Cultivo mixto heterólogo incubado con fracción 4S de suero de gestantes desprovisto de AFP	80
3.5.9.6.	Cultivo de células T en presencia de AFP purificada y fracción 4S de suero de gestantes desprovisto de AFP	81
3.5.10.	Recogida de los cultivos	81
3.6.	Ensayo de citotoxicidad	83
3.7.	Estudio cinético de subpoblaciones de células T mediante anticuerpos monoclonales	85
4.	RESULTADOS	86
4.1.	Efecto del suero de gestantes en cultivos de linfocitos	87

4.1.1.	Respuesta de linfocitos T estimulados con PHA en presen_	
	cia de sueros de mujeres embarazadas	87
4.1.2.	Efecto de la presencia de células B en cultivos de células	
	T estimulados con PHA o PWM e incubados con sueros de muje_	
	res gestantes	88
4.2.	Alfa-fetoproteína	99
4.2.1.	Aislamiento de AFP	99
4.2.2.	Efecto de la AFP purificada en cultivos de linfocitos T	
	estimulados con PHA	100
4.3.	Efecto del suero de gestantes desprovisto de AFP, sobre	
	cultivos de linfocitos T estimulados con PHA	120
4.3.1.	Suero de mujeres gestantes desprovisto de AFP	120
4.3.2.	Ensayo de citotóxicidad	120
4.3.3.	Estudio de subpoblaciones celulares	120
4.3.4.	Filtración a través de Sephadex G-200 superfino	121
4.3.5.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	121
4.3.6.	Estudio de las fracciones 19S, 7S y 4S en cultivos de cé_	
	lulas T estimulados con PHA	121
4.3.7.	Ensayo de citotóxicidad de la fracción 4S	123
4.3.8.	Efecto de la fracción 4S en cultivos mixtos heterólogos	123
4.3.9.	Estudio de subpoblaciones celulares en cultivos de linfo_	
	citots T incubados con la fracción 4S de suero de gestantes	
	desprovisto de AFP	124
4.3.10	Análisis cuantitativo de la fracción 4S de suero de ges_	
	tantes desprovisto de AFP	124
4.4.	Cultivos de células T incubadas en presencia de AFP puri_	
	ficada y de la fracción 4S de suero de gestantes despro_	

visto de AFP	148
5.DISCUSION	150
6.CONCLUSIONES	165
7.BIBLIOGRAFIA	168

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
α_1 g ácida	α_1 glicoproteína ácida
AFP	alfa-fetoproteína
α MG	alfa-metil glucósido
AG	antígeno
AH	albúmina humana
α_2 PAG	α_2 glicoproteína asociada al embarazo, (pregnancy associated α_2 glicoprotein)
B_1 PAM	B_1 macroglobulina asociada al embarazo, (pregnancy associated B_1 macroglobulin)
CER	ceruloplasmina
Con A	concanavalina A
D.O.	densidad óptica
EPF	factor temprano del embarazo, (early pregnancy factor)
HCG	gonadotropina coriónica humana, (human chorionic gonadotropin)
HPL	lactógeno placentario humano, (human placental lactogen)
i	índice de estimulación
Ig	inmunoglobulina
MHC	sistema principal de histocompatibilidad, (major histocompatibility complex)
p	probabilidad
PAPP-A	proteína A del plasma asociada al embarazo, (pregnancy associated plasma protein A)
PEG	polietilen-glicol
PHA	fitohemoaglutinina

PSB ₁ G	B ₁ glicoproteína específica del embarazo, (pregnancy specific B ₁ -glicoprotein)
PWM	pokeweed (Phytolacca americana)
RIA	radioinmunoensayo, (radioinmuno- assay)
SA	suero autólogo
SAH	suero anti-humano
SDS	dodecil sulfato sódico, (sodium dodecyl sulfate)
SE	suero de mujer embarazada
SE-AFP	suero de mujer embarazada desprovisto de alfa-fetoproteína
SHN	suero humano normal
TA	temperatura ambiente
Tº	tiempo

1-INTRODUCCION

1.1 SISTEMA INMUNE

1.1.1 GENERALIDADES

El conjunto de estructuras orgánicas que desarrollan la función inmunológica, se denomina Sistema Inmune. Cuando funciona adecuadamente, sus componentes integrados proporcionan una respuesta general de protección al organismo.

Está constituido por el tejido linfoide, que consiste en una malla de células reticulares, células linfoides, células accesorias y fibras entrelazadas, con un marco de sostén de células reticulares asociadas a vasos linfáticos.

El linfocito, es la célula básica en el sistema inmune, ocupa los intersticios de las mallas y juega un papel crucial en la iniciación y desarrollo de la inmunidad humoral y celular. Hay dos categorías de linfocitos: linfocitos T, responsables de la inmunidad celular y linfocitos B, encargados de la síntesis de anticuerpos.

El tejido linfoide humano, se distribuye en los nódulos linfáticos ganglios linfáticos, bazo, timo, placas de Peyer, apéndice y amígdalas. Estas tres últimas estructuras, están formadas por la confluencia de folículos linfáticos (1).

Los órganos linfoides, poseen dos compartimentos funcionales: zona timo-dependiente o área de linfocitos T y zona timo-independiente o área de linfocitos B. Ambos compartimentos, están poblados de linfocitos en distintos grados de diferenciación, con frecuentes mitosis.

Las áreas timo-dependientes incluyen: timo, vainas linfáticas periarteriales de la pulpa blanca del bazo, zonas paracortical e interfolicular de los ganglios linfáticos y áreas interfoliculares de las placas de Peyer

Las áreas timo-independientes, se localizan en la zona periférica

de la pulpa blanca y folículos primarios del bazo, zona cortical, folículos primarios y médula de los ganglios linfáticos y por último folículos formados de las placas de Peyer, amígdalas y apéndice.

1.1.2 ONTOGENIA Y DIFERENCIACION DE LINFOCITOS

Los linfocitos se originan a partir de las células madre de la médula ósea (células stem), las cuales son células no especializadas, caracterizadas por tener una gran capacidad para proliferar activamente, permaneciendo su número constante en sujetos adultos normales. Son pluripotentes, es decir, son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular. En cierto momento de su vida, la célula madre decide entre permanecer como célula pluripotente o diferenciarse en célula madura.

La cinética de proliferación de cualquier célula, consta de cuatro fases: durante la fase G1, la célula realiza su función, replica su DNA durante la fase S, se prepara para la división en la fase G2 y finalmente entra en mitosis. La mayoría de las células madre, sin embargo, permanecen en un extenso periodo de inactividad denominado fase G0, que posteriormente abandonan, comenzando el ciclo en la fase S, para convertirse en células maduras.

Las células madre, son morfológicamente heterogéneas. En adultos, se localizan preferentemente en la médula ósea y en menor cantidad en el bazo y en la sangre. En embriones, sin embargo, se distribuyen fundamentalmente en el bazo, hígado y saco vitelino.

Las células madre dan origen a las células progenitoras: células unipotentes que dan lugar a cuatro líneas de diferenciación potencial: línea eritrocítica, línea trombocítica, línea granulocítica y monocítica, línea linfocítica.

1.1.3 LINEA LINFOCITICA

En la médula ósea, cada célula madre, da lugar a dos células

progenitoras, que se diferencian tras una serie de etapas, en linfocitos T procesados por el timo y linfocitos B o timo independientes (2). El linfocito es una célula con 7-12 μm de diámetro, con escaso citoplasma y gran cantidad de ribosomas libres o formando polisomas. Su núcleo es redondeado y contiene gran cantidad de cromatina.

Los linfocitos T o timo-dependientes, se distinguen por la presencia de receptores de superficie para eritrocitos de carnero. "In vitro", proliferan tras su estimulación por antígenos o mitógenos no específicos y no sintetizan inmunoglobulinas.

Las células T, maduran en el microambiente del timo, que actúa sobre las células primitivas procedentes de la médula ósea a través de factores humorales tímicos de dos formas: modulan la transformación de las células pretímicas en células postímicas funcionales y continúan ejerciendo su acción sobre la actividad funcional de las células T, después de que éstas hayan abandonado el medio tímico (3).

Los linfocitos timo-independientes o linfocitos B, no presentan receptores de superficie para eritrocitos de carnero y la mayoría portan inmunoglobulinas de superficie. "In vitro", sintetizan inmunoglobulinas en respuesta al estímulo con mitógenos y anticuerpos específicos en respuesta a antígenos, tales como hematies de carnero, toxinas de la difteria etc...La especificidad de las células B para cada tipo de antígeno, viene determinada por su inmunoglobulina de superficie. La estimulación del linfocito B por el antígeno está regulada por la estructura inmune Ia (localizada en el sistema principal de histocompatibilidad MHC), que como producto de los genes Ir o de la respuesta inmune, programa la respuesta de los anticuerpos.

La cantidad de linfocitos T y B en el organismo, es difícil de determinar. No solo influyen las dificultades técnicas, sino que sus

valores estan afectados por factores fisiológicos tales como ritmo diario, edad, ciclo menstrual y otros de tipo ambiental, como alimentación, medio de vida etc...

1.1.4 LINFOCITOS T

1.1.4.1 ETAPAS DE DIFERENCIACION

Los linfocitos T, proceden de las mismas células madre que dan origen a las otras células sanguíneas. Las células madre producen células progenitoras, las cuales entran en el timo y se convierten en linfocitos tímicos: timocitos. Posteriormente, abandonan el timo y maduran convirtiendose en linfocitos T inmunológicamente competentes, comenzando su vida como células circulantes. Cuando un linfocito T encuentra un agente estimulante, entra en fase funcional activa. Aquellos que no han recibido dicho estímulo, permanecen en la circulación o en los ganglios linfáticos, durante cierto periodo de tiempo. Por lo tanto el curso de vida de un linfocito, se desarrolla en tres etapas: PRETIMICA, TIMICA y POST-TIMICA.

A-Fase-Pretímica

En esta etapa, las células progenitoras de los linfocitos proceden en un principio del hígado fetal y después de la médula ósea, entran en el timo a través del torrente sanguíneo. La entrada es selectiva y unidireccional. La emigración tiene lugar principalmente durante el periodo embrionario y postnatal. En el adulto el número de células progenitoras que inmigran en el timo, declina gradualmente con la edad.

B-Fase-Tímica

En ella tiene lugar la diferenciación de células progenitoras en timocitos. Primero las células progenitoras proliferan en el cortex tímico durante tres días, en los cuales las células se dividen de 6 a 8

veces con un tiempo medio de generación de 9 horas. Posteriormente la proliferación se extiende a la médula tímica y nuevas células progenitoras son admitidas en el timo.

En el proceso de diferenciación de los timocitos, las células epiteliales del timo tienen una función esencial, ya que secretan factores humorales tales como timosina y timopoyetina, necesarios para la iniciación y mantenimiento de la diferenciación.

Durante la diferenciación de las células progenitoras en timocitos corticales y medulares, hay cambios progresivos de sus propiedades, lo cual es útil para diferenciar los distintos estadios de madurez.

MARCADORES DE DIFERENCIACION TIMICA

El mejor criterio para distinguir linfocitos o poblaciones linfocitárias, son los marcadores de superficie. La mayoría se han caracterizado sobre células de ratón. En el hombre solo se han encontrado algunas estructuras similares, pero es posible que se encuentre una mayor analogía a medida que se perfeccionen las técnicas de detección (4),(5).

A continuación se describen algunos de los marcadores de los timocitos humanos y de ratón, los cuales identifican los timocitos corticales y medulares.

I-Aloantígenos controlados por el Sistema Principal de Histocompatibilidad MHC

Son moléculas antigénicas, localizadas en la membrana celular. Se dividen en dos clases: Clase I y Clase II. Los antígenos de la Clase I, están presentes en la mayoría de las células de un organismo adulto, pero distribuidos en diferentes cantidades. La distribución esta controlada genéticamente. Los antígenos de la Clase II, están presentes solo en ciertos tipos de células (subpoblaciones de linfocitos).

Los timocitos corticales y medulares, se pueden identificar según la distribución de aloantígenos controlados por el sistema MHC. Los timocitos corticales, tienen bajo contenido de antígenos de la Clase I y los timocitos medulares tienen alto contenido en antígenos de esta Clase.

II-Aloantígenos controlados por los loci Thy1, LyT y TLa

Son también moléculas antigénicas, localizadas en la membrana celular. Todos ellos están ausentes en las células progenitoras.

- SISTEMA TLa -

Es un complejo de cuatro antígenos, codificados en un locus tres de los cuales son propios de timocitos de ratón, el cuarto es un carácter leucémico que aparece sobre linfocitos maduros.

-SISTEMA LyT-

Es un complejo de cuatro especificidades antigénicas dialélicas, codificadas por dos cromosomas distintos. No solo se hayan presentes en timocitos de ratón, sino también en linfocitos periféricos y son utilizados como marcadores funcionales de subpoblaciones T. Los más utilizados son LyT1 y LyT2.

-ANTIGENO Thy1-

Es un carácter localizado en un locus dialélico, aparece en las primeras etapas de maduración intratímica y se pierde a medida que avanza el proceso. Su proporción es muy baja una vez alcanzado el máximo grado de madurez.

Los timocitos corticales y medulares tienen distinta distribución de estos aloantígenos; los timocitos corticales poseen un alto contenido en Thy1 y LyT, mientras que los timocitos medulares tienen bajo contenido en ambos tipos de aloantígenos.

Los marcadores metabólicos, también son de utilidad en la identi_

ficación. La desoxinucleotidiltransferasa, es un enzima DNA polimerizante, que se encuentra distribuida en la membrana y el citoplasma de los timocitos corticales. Sin embargo, los timocitos medulares carecen por completo de este enzima.

Por otro lado, la funcionalidad de los timocitos corticales y medulares con respecto a agentes externos es diferente, por ejemplo, los timocitos corticales de ratón son muy sensibles a esteroides, mientras que los timocitos medulares, son relativamente resistentes.

En cuanto a la radiosensibilidad, los timocitos corticales son muy sensibles y los timocitos medulares son resistentes.

La respuesta a mitógenos tambien difiere de unos a otros, así, los timocitos medulares responden a la fitohemoaglutinina (PHA) y a la concanavalina A (Con A), mientras que los corticales no tienen respuesta estimulatória a PHA y responden levemente a Con A.

En cuanto a las propiedades físicas, los timocitos corticales son células de pequeño tamaño, con gran actividad mitótica y baja movilidad electroforética. Por el contrario, los timocitos medulares son células de tamaño medio, con alta movilidad electroforética y escasa actividad mitótica.

C-Fase Post-tímica

Del timo, salen dos poblaciones de linfocitos T inmaduros y acuden al bazo o a los ganglios linfáticos a través de los vasos sanguíneos o linfáticos. Los timocitos que acuden al bazo, podrían ser derivados de los timocitos corticales. Son de corta vida, sensibles a la cortisona y se localizan en la pulpa roja. Los timocitos medulares posiblemente den lugar a los linfocitos que se dirigen a la zona paracortical de los ganglios linfáticos y a la pulpa blanca del bazo. Son de larga vida y resistentes

a la cortisona.

Una vez que los linfocitos alcanzan suficiente grado de madurez se dirigen a través del torrente sanguíneo, hacia la zona paracortical y áreas interfoliculares de los nódulos linfáticos, donde permanecen durante corto periodo de tiempo.

Posteriormente emigran a la médula y a través de los senos medulares, son transportados pasivamente via vasos linfáticos eferentes al conducto torácico. El conducto torácico, vierte su contenido en la sangre, que distribuye los linfocitos circulantes a las áreas timo dependientes de los órganos linfoides y solo un 3% a los tejidos no linfoides.

Cuando un linfocito en el periodo de célula circulante, encuentra un antígeno o se estimula por cualquier otro agente, experimenta cambios en su membrana y entra en una fase activa, durante la cual la célula se transforma, sintetizando DNA, RNA y proteínas. La célula transformada se denomina blasto, es de gran tamaño (20-30µm de diámetro), con abundante citoplasma, cromatina reticulada y varios nucleolos en su núcleo. Posteriormente el blasto prolifera repetidamente, siendo la progenie de menor tamaño en cada división. En la última generación, los linfocitos vuelven a ser otra vez pequeños (7-12µm de diámetro) y se incorporan de nuevo en la circulación sanguínea.

El contacto con el antígeno, puede tener lugar en varios puntos. Cuando el linfocito encuentra el agente extraño, en un tejido no linfoide se dirige a los nódulos linfáticos más cercanos, donde se transforma y prolifera. Los pequeños linfocitos derivados de las células activadas, entran de nuevo en el torrente sanguíneo. Por otro lado, si el encuentro tiene lugar en la sangre, el linfocito se dirige al bazo donde prolifera y parte de su progenie migra al intestino, localizándose en las placas de

Peyer.

Este tráfico linfocítico entre los tejidos, órganos linfoides y torrente sanguíneo, permite a las células sensibles al antígeno, buscar el agente extraño y ser reclutadas en los sitios en los que está ocurriendo una respuesta, mientras que la diseminación de las células de la memoria y de su progenie, hace que la respuesta sea más efectiva a lo largo de todo el sistema linfoide. Así, las células que reaccionan con el antígeno, son eliminadas de la circulación, pasando a localizarse en los ganglios linfáticos bazo o tejido no linfoide.

La acumulación de los linfocitos en el interior de los órganos linfoides periféricos, es muy efectiva; posiblemente sea debido a cambios en su membrana plasmática que imposibiliten el paso a través de los órganos (6). Además los blastos liberan sustancias capaces de atraer otros linfocitos al interior de los órganos linfoides, los cuales amplifican la reacción inmune, no específica.

Los linfocitos T, tienen dos funciones principales: destrucción de las células que por diversas razones han alterado sus propias características y regulación de la respuesta inmune. Ambas funciones son realizadas bien directamente por contacto célula-célula o secretando sustancias activas dirigidas a macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células B e incluso a otras células T. Todas estas células pueden verse afectadas de diferentes maneras, así los linfocitos T activados, pueden actuar; alistando granulocitos y macrófagos, activando la función granulocítica y suprimiendo o estimulando linfocitos T o B.

A continuación, se citan los principales factores liberados por las células activadas dirigidas a los propios linfocitos y a otros tipos celulares (6).

- * Interleukina 2. También denominado factor de crecimiento de las células T.
- * Interleukina 1. Factor activador de linfocitos
- * Factor reemplazante de células T. Con acción cooperadora.
- * Factor supresor de la actividad linfocítica (7).
- * Factor responsable de transferir la hipersensibilidad retardada a individuos no sensibilizados. Factor de transferencia
- * Factor inhibidor de la migración de macrófagos
- * Factor activador de macrófagos
- * Factor estimulante de la quimiotaxis de macrófagos
- * Factor inhibidor de la migración leucocitaria
- * Factor estimulante de la quimiotaxis leucocitaria
- * Linfotoxina. Factor citotóxico linfocítico.
- * Interferón.

1.1.4.2 MARCADORES DE LINFOCITOS T PERIFERICOS

Las células T, despliegan un alto grado de heterogeneidad funcional. En el ratón han sido atribuidas varias funciones fisiológicas de estas células a las subpoblaciones T, las cuales pueden ser caracterizadas por distintas propiedades de membrana tales como:

- A) Expresión de antígenos de superficie codificados por distintos loci génicos LyT 1,2.
- B) Expresión de diferentes cantidades de aloantígenos Thy1 y 2 y su asociación con el sistema principal de antígenos de histocompatibilidad (MHC).
- C) Presencia o ausencia de receptores para la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina.
- D) Detección de antígenos de superficie por anticuerpos monoclonales.
- E) Receptores para hematíes de carnero.

A y B) Los aloantígenos LyT y Thy, fueron citados en el apartado anterior.

C) Receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

Los receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, son característicos de linfocitos B, sin embargo, en algunos casos, se demuestra mediante técnicas especiales, la presencia de estos receptores sobre la superficie de linfocitos T.

En 1977, Moretta y colaboradores (8), asociaron la presencia de un tipo determinado de receptor de inmunoglobulina, con un posible papel funcional en la producción de anticuerpos. Demostraron que poblaciones con receptores para el Fc de la IgG (Ty) ejercían una acción supresora sobre la proliferación de células B.

Las poblaciones que presentaban receptores para IgM (Ty), cooperaban en la producción de anticuerpos (8),(9),(10).

El descubrimiento de receptores para IgA en poblaciones cuya funcionalidad no estaba clara, la dificultad en la repetición de los experimentos y la evidencia de que el efecto final cooperador o supresor, dependía de la proporción de linfocitos T con receptores para IgG e IgM, pusieron en duda los resultados iniciales.(11),(12).

Actualmente, se considera que los receptores Fc sobre los linfocitos T, son marcadores de diferenciación de la edad adulta y posiblemente de poblaciones con distinta funcionalidad. Su influencia en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas, está aún por aclarar.(13).

Estos marcadores, no son exclusivos de linfocitos. Se han detectado sobre macrófagos, células nulas, células K y células NK.

D) Anticuerpos monoclonales

La puesta a punto de las técnicas de monoclonación de proteínas, mediante la hibridación celular, ha permitido la obtención de anticuerpos

monoespecíficos, capaces de diferenciar las distintas poblaciones funcionales de linfocitos T hasta el momento conocidas (14),(15). Los hibridomas secretan anticuerpos monoclonales a varios antígenos de superficie. El carácter monoclonal del anticuerpo, reconoce exclusivamente estructuras de superficie propias de cada una de las subpoblaciones, presentando un alto grado de especificidad (16),(17),(18),(19).

Se ha demostrado, que hay una escasa correlación entre las subclases definidas por anticuerpos monoclonales y por receptores para el Fc de las inmunoglobulinas.

E) Receptores para hematíes de carnero

Los linfocitos T, poseen un conjunto de estructuras en su superficie de naturaleza desconocida que permite la formación de rosetas espontáneas con hematíes de carnero. Esta reacción no tiene base inmunológica precisa.

1.1.4.3 HETEROGENEIDAD FUNCIONAL DE LINFOCITOS T

En función del modelo antigénico de superficie de las células T, se han caracterizado tres categorías funcionales distintas: linfocitos T cooperadores, linfocitos T supresores y linfocitos T citotóxicos.

Los linfocitos T cooperadores, constituyen cerca del 1/3 de la población madura, son programadas para amplificar la función de otras células (células T, células B y macrófagos). Para desempeñar una función cooperadora deben ser estimulados por un antígeno en asociación con una molécula de la Clase II del sistema MHC.

"In vitro", la síntesis de inmunoglobulinas es dependiente de la presencia de un número adecuado de linfocitos T en el cultivo. El control de la respuesta a un estímulo policlonal, requiere la participación primaria de células cooperadoras, cuyas señales inducen de forma secundaria la activación de linfocitos B (20). La cooperación depende de la manera

de presentar el antígeno a los linfocitos B.

Los linfocitos T cooperadores, presentan receptores para el Fc de la IgM (9).(21), pero esta característica estructural, no es exclusiva de éste tipo de diferenciación, puesto que se han detectado células con receptores para IgA con función cooperadora.

Con respecto a los aloantígenos LyT, los linfocitos T cooperadores de ratón, tienen fenotipo Ly1+2- y por la técnica de anticuerpos monoclonales, las células T cooperadoras humanas, son positivas para anticuerpo OKT4.

El sistema inmune, funciona a través de un elaborado conjunto de interacciones celulares, algunas de las cuales inician y otras limitan las respuestas inmunes específicas. Esta segunda función está realizada por los linfocitos T supresores; su mecanismo de acción, todavía no se conoce. Parece que actúan reconociendo sitios de combinación específica para el antígeno denominados idiotipos, localizados sobre la superficie de otras células inmunológicamente activas. El idiotype estimula la respuesta de un anti-idiotipo que limita la extensión de la respuesta inicial.

Su papel central en la modulación de la respuesta inmune, hace pensar que una alteración funcional, ya sea primaria o secundaria, contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes, cáncer e infecciones crónicas (22).

Los precursores de los linfocitos T supresores, son activados por un antígeno, a veces en asociación con una molécula de la Clase II del sistema MHC. También pueden ser activados inespecíficamente por mitógenos (23),(24).

La respuesta de las células T cooperadoras, puede ser suprimida por factores liberados por los linfocitos T supresores.

Con respecto a los aloantígenos LyT, tienen fenotipo Ly1- Ly2+,

en el ratón y son OKT8 positivas en el hombre, por la técnica de anticuerpos monoclonales específicos.

Las células supresoras, podrían participar en el control de otros modelos de diferenciación celular, no relacionados con el sistema inmune: eritropoyesis, granulopoyesis y serie plaquetaria.

0
53 80
Los linfocitos T citotóxicos, están sensibilizados para eliminar células que portan ciertos determinantes antigénicos. La destrucción de las células diana, se realiza alterando la permeabilidad de la membrana celular, por lo que contribuyen a la defensa del huésped contra una amplia gama de infecciones víricas, bacterianas y parasitarias (3) y son responsables de las alteraciones inmunológicas derivadas.

La acción de las células citotóxicas puede ser inducida por drogas o simples haptenos ligados a la superficie celular.

Para la eficacia de la función citotóxica, las células precursoras deben ser estimuladas por un antígeno en asociación con una molécula de aloantígeno de la Clase I del sistema MHC. Los aloantígenos de las Clases I y II, pueden activar por sí solos las células T citotóxicas, en ausencia de otros antígenos diferenciados.

Las células T citotóxicas de ratón, así como las T supresoras, tienen fenotipo Ly1-2+ y en el hombre son OKT8 positivas.

Por otro lado se han identificado células con apariencia de linfocitos, que no tienen o han perdido los marcadores propios de linfocíticos. Este grupo celular, está constituido por las denominadas células nulas.

Las células que poseen actividad citotóxica no específica, se denominan células K (killer). Tienen receptores para el Fc de las inmunoglobulinas y el contacto con las células recubiertas de anticuerpos, determina la lisis celular. Este tipo de respuesta, está implicado en la defensa

del huésped contra la infección y en la patogénesis del daño tisular producido en muchos desórdenes inmunológicos.

Otro grupo celular, son las células NK (natural killer), derivadas también de la médula ósea.

Las células NK murinas, poseen moléculas de antígeno Thy1 sobre su superficie y receptores para la porción Fc de la molécula de IgG. Su tamaño es mayor que el de los linfocitos T y en contraste con ellos las células NK humanas, tienen receptores de baja afinidad para eritrocitos de carnero, formando rosetas espontáneas, únicamente a 4°C. Son células relativamente radio-resistentes, no adherentes y no fagocíticas.

Las células NK, están ausentes en el hígado y bazo de ratones recién nacidos. Aparecen a los 21 días de edad, alcanzando el máximo en el tercer mes de vida extrauterina y declinando posteriormente con la edad.

La función de las células NK y su grado de especificidad permanecen sin esclarecer. Es probable que tengan un importante papel en el control del desarrollo de las células tumorales, ya que son capaces de actuar contra las células tumorales, sin sensibilización previa (25),(26). Tienen actividad lítica hacia las células madre de la médula ósea y hacia los timocitos corticales inmaduros (27).

1.1.5 LINFOCITOS B

1.1.5.1 GENERALIDADES

La característica principal de los linfocitos B, es su directa implicación en la síntesis de inmunoglobulinas. La molécula sintetizada, puede permanecer en el citoplasma celular, incorporarse en la superficie de la membrana plasmática o ser secretada al medio externo celular como anticuerpo.

Las inmunoglobulinas de superficie, son responsables del reconoci_

miento antigénico. Además, los linfocitos B poseen receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas ajenas. Se ha estimado que un linfocito B maduro, lleva aproximadamente mil moléculas de inmunoglobulina (Ig) uniformemente repartidas en su superficie. La distribución de las distintas clases de Ig, es variable, dependiendo de la especie, edad y condición fisiológica, pero las moléculas de IgM, son el isotipo predominante, seguido de IgD, IgG e IgA (28).

1.1.5.2 ONTOGENIA DE LINFOCITOS B

Los linfocitos B, proceden de las mismas células madre que dan origen a las células T. Las células madre, procedentes del saco vitelino, emigran a la zona medular de la bolsa de Fabricio en aves o al hígado fetal en mamíferos. Simultáneamente, comienza la etapa de proliferación celular con un tiempo medio de generación de 7 a 9 horas. Posteriormente, se detectan las primeras células con moléculas de IgM en su superficie. En los primeros días de la vida postnatal, aparecen células con IgG e IgA y hasta dos semanas después del nacimiento, no se visualizan células con IgD en su membrana.

En aves la bolsa de Fabricio continúa su función como fuente de linfocitos B a lo largo de toda la vida, aunque su actividad declina con la edad. En mamíferos, la producción de linfocitos B, es transferida desde el hígado fetal a la médula ósea fetal y definitiva.

Se ha estimado que se exportan cien millones de células diarias desde la médula ósea a las áreas B dependientes de los órganos linfoides.

1.1.5.3 ETAPAS DE DIFERENCIACION DE LINFOCITOS B

En la línea de diferenciación de linfocitos B, se han detectado cinco tipos celulares, denominados: células pre-B, células B vírgenes, células B maduras, células de memoria y células plasmáticas.

Las células pre-B, son las primeras definidas en el linaje celular,

se caracterizan por la presencia de cadenas pesadas de IgM en su citoplasma. Las células B vírgenes o B inmaduras, además de presentar la característica de las células pre-B, portan IgM en su superficie. Las células B maduras, están encomendadas eventualmente, a la secreción de una clase determinada de inmunoglobulina. Cada célula comprometida, queda etiquetada por la expresión de una o varias clases de Ig sobre su membrana celular. Así, células dedicadas a la síntesis de IgM, expresan IgM en su superficie. Sin embargo células designadas para la síntesis de IgG, portan IgG e IgM. Células comprometidas en la síntesis de IgA o IgE, portan IgM, IgA e IgM, IgE respectivamente (29).

Algunas de estas células, también expresan isotipos IgD en su membrana plasmática. Así, las células que llevan sobre su superficie IgM e IgD, dan lugar a una respuesta de anticuerpos IgM.

Se piensa que las moléculas de IgM, localizadas en la superficie celular, intervienen en la producción de células productoras de anticuerpos y la IgD, en la protección de los linfocitos B contra los fenómenos de tolerancia (30),(31). Las células de la memoria, están definidas por su capacidad para responder a estímulos específicos, posibilitando una respuesta más intensa y acelerada, en un segundo encuentro con el antígeno.

Por último, las células plasmáticas se encuentran junto con las células de la memoria, en el último de los estadios transitorios del desarrollo de las células B. Son células ovales, con citoplasma altamente basófilo rico en retículo endoplásmico rugoso y gran cantidad de ribosomas libres. El núcleo está localizado excéntricamente en el óvalo celular y la heterocromatina está distribuída en pequeñas masas adheridas a la membrana nuclear. Las células plasmáticas, están ampliamente distribuídas, siendo particularmente abundantes en los tejidos linfoides y en los tejidos conecti_

vos más expuestos a agentes extraños. Las células plasmáticas, viven pocas semanas; secretan anticuerpos intensivamente y despues mueren.

1.1.5.4 CICLO VITAL DE LOS LINFOCITOS B

En aves y mamíferos, la fase antígeno independiente de linfocitos B, tiene lugar en la bolsa de Fabricio y en la médula ósea respectivamente, donde se originan las células B vírgenes que migran a las zonas timo indepen_ dientes de los órganos linfoides. Si transcurrido cierto tiempo, no reciben estímulo, las células vírgenes mueren. Si se estimulan, pueden diferenciarse en dos vías:

a) bien convertirse en células plasmáticas productoras de anticuer_ pos y migrar a la zona medular de los nódulos linfáticos, a la pulpa roja del bazo o a la submucosa y lámina propia de los tractos gastrointestinal y respiratorio.

b) o bien transformarse en grandes blastos muy prolíferos, que dan lugar a linfocitos de pequeño tamaño, caracterizados por ser células B de memoria, capaces de acelerar la respuesta en un segundo encuentro con el antígeno. Las células de la memoria, se acumulan en los centros germinales de los folículos linfoides, después de una corta residencia, son transportadas en la linfa por medio de los vasos linfáticos eferentes al conducto torácico, el cual vierte su contenido en la circulación sanguínea. Las células B de la memoria, alojadas en el bazo, entran en la circulación directamente. El torrente sanguíneo, distribuye de nuevo las células por los nódulos linfáticos, bazo y tejido no linfoide, siendo recogidas posterior_ mente por los vasos linfáticos aferentes.

1.1.5.5 MARCADORES DE LINFOCITOS B

Además de los receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, marcador característicos, los linfocitos B poseen otras estructuras sobre

su superficie que facilitan su identificación (4),(32).

Aloantígenos LyT 4,6,7 y 8

El más conocido es el producto del locus 4/2. Es un antígeno selectivo que se expresa durante la diferenciación de los linfocitos B y se mantiene en las células plasmáticas.

Antígeno MBLA y MSPCA

Ambos son propios del ratón y del hombre. El primero es el primer marcador diferencial de linfocitos B. El segundo aparece a lo largo de la diferenciación, paralelamente al antígeno 1 de la célula plasmática (Pca 1) y se mantiene sobre células maduras secretoras

Receptores para componentes del complemento

Tienen una función esencial en los mecanismos de control de la respuesta inmune. Sobre la superficie de linfocitos B, se han detectado receptores para C3b y C4b (32). Ambos cooperan en la unión de los complejos antígeno anticuerpo sobre la superficie celular. Aparecen en un estado de diferenciación posterior a las inmunoglobulinas y desaparecen una vez alcanzado el máximo grado de madurez.

Los linfocitos B, forman rosetas con hematíes de carnero recubiertos de componente C3 del complemento.

Aloantígenos de la Clase II, controlados por el MHC

En el hombre, están codificados por la región D del sistema génico HLA. Sus productos, son dos glicoproteínas expresadas como una única molécula sobre la superficie de los linfocitos B. También se han localizado en algunos linfocitos T y macrófagos, responsables de la presentación del antígeno. influyen en la eficacia de las interacciones celulares en los procesos de inmunoregulación (33).

1.1.6 LECTINAS

Son proteínas extraídas de plantas, que tienen tres características decisorias para su amplio uso en laboratorio, como medida de inmunidad celular (34),(35),(36). Poseen una alta especificidad para los carbohidratos, uniéndose a oligosacáridos presentes en la superficie de la célula. Producen aglutinación celular y son sustancias estimulantes de la mitosis, es decir son sustancias mitogénicas.

Un linfocito expuesto a la acción de las lectinas, manifiesta el mismo espectro de características funcionales que un linfocito estimulado por un antígeno.

Las lectinas mas frecuentemente utilizadas en Inmunología son: Fitohemoaglutinina (PHA), Concanavalina A (Con A) y la lectina extraída de la raíz de *Phytolaca americana* (Pokeweed), PWM.

La Fitohemoaglutinina, se extrae de judías de la especie *Phaseolus vulgaris* (37). Su estructura molecular consta de un tetrámero compuesto de dos clases de subunidades L y R. La PHA comercial es una mezcla de las cinco posibles combinaciones de ambas subunidades, con gran afinidad por el azucar N-acetilgalactosamina.

La Concanavalina A, se extrae tambien de judías de la especie *Canavalia ensiformis*. Su molécula consiste en cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales, está constituida por una sola cadena polipeptídica. Las moléculas de Con A tienen una gran afinidad por los residuos de alfa-D-manosa o alfa-D-glucosa.

Ambas PHA y Con A, son mitógenos inespecíficos que activan los linfocitos T, pero influyen sobre ambas poblaciones, debido a que los linfocitos T estimulados liberan factores solubles que favorecen la reacción

de los linfocitos B.

La lectina extraída de la especie *Phytolaca americana* (Pokeweed), es un mitógeno inespecífico que tiene actividad mitogénica sobre linfocitos B y T, aunque la respuesta de éstos últimos es muy baja.

1.2 FETO COMO ALOINJERTO

1.2.1 INTRODUCCION

Desde el punto de vista inmunológico, el embarazo plantea una serie de interrogantes. Es sorprendente el hecho de que la madre, estando dotada de un sistema linforeticular completo, aloje un embrión genotípicamente diferente. Por otro lado, el feto es capaz de sobrevivir ininterrumpidamente durante nueve meses en contacto anatómico y funcional con las células uterinas maternas, sin que se produzcan las reacciones alérgicas consecuentes.

El sistema inmune, es extremadamente efectivo en deshacerse de material extraño, que detecta inmediatamente como no propio. Así, un injerto de piel de un donante no relacionado genéticamente, es rechazado en diez días y una proteína inyectada en solución, puede ser eliminada totalmente de la circulación, en el mismo tiempo. En ambos casos, el estado de inmunidad es inducido y persiste posiblemente durante el resto de la vida del sujeto inmunizado.

Todas las ulteriores presentaciones de ese material extraño, serán rechazadas con mayor rapidez que en el primer encuentro. La mayoría de las veces, la materia ajena, es eliminada o minimizada hasta niveles tolerables por el sistema inmune.

La reproducción, presenta varias circunstancias donde el sistema inmune no es resolutivo en cuanto a la destrucción de "lo no propio" (38).

Primeramente, los espermatozoides no son destruidos inmunológicamente, al menos hasta después de la fertilización. Por lo que la respuesta inmune femenina en este caso, es singularmente inefectiva.

El embarazo, es el segundo caso donde la función del sistema inmune declina aparentemente, permitiendo la supervivencia del feto, el cual superficialmente es análogo a un injerto de piel. Genéticamente, la

mitad de su genotipo es de origen paterno, por lo que podría ser rechazado, como ocurre en algunos trasplantes de piel.

Las consecuencias inmunológicas del embarazo, son complejas, variables e impredecibles.

1.2.2 MECANISMOS DE PROTECCION FETAL

A lo largo de la historia de la Inmunología de la reproducción, han sido propuestos varios mecanismos interdependientes para explicar la protección fetal.

- * El útero es un lugar inmunológicamente privilegiado.
- * Feto no inmunogénico
- * Inmunocompetencia inmunológica materna disminuída
- * Tolerancia inmunológica de la madre para el feto.
- * Barrera anatómica placentaria.

1.2.2.1 EL UTERO ES UN LUGAR INMUNOLOGICAMENTE PRIVILEGIADO

La decidualización del endometrio y el establecimiento del embarazo, podría impedir el drenaje linfático aferente del útero, desviando los antígenos del sistema linfático a la sangre, lo cual predispondría al sistema inmune a favor de la producción de anticuerpos bloqueantes que impedirían una respuesta potencial, de índole citotóxica. Sin embargo, aunque los ganglios linfáticos paraaórticos que drenan la linfa en el útero, son capaces de iniciar y efectuar una respuesta inmune, parece que el útero no es indispensable para el mantenimiento del feto ya que algunas veces, el blastocisto ha escapado de los confines del oviducto, implantándose fuera del utero (39). La mayoría de estos embarazos ectópicos, se han malogrado, pero un bajísimo porcentaje llega a su término, señalando que la contribución uterina a la supervivencia inmunológica del feto, no es absoluta.

1.2.2.2 FETO NO INMUNOGENICO

En murinos, el sincitiotrofoblasto placentario, es decir la capa celular del trofoblasto que forma la placenta fetal, expresa antígenos de histocompatibilidad, algunos de los cuales son de origen paterno.

En humanos, los datos son contradictorios acerca de la existencia de antígenos HLA en las células del trofoblasto (40),(41). Sin embargo, en la circulación materna, se han detectado anticuerpos anti-HLA-A y anti-HLA-B, que son más frecuentes en los sucesivos embarazos (42). Por otro lado, la presencia de antígenos TA-1 y TA-2 ha sido confirmada en la placenta humana, pero su inmunogenicidad potencial durante el embarazo no ha sido demostrada (43).

La cara fetal de la placenta murina tiene aloantígenos de la Clase I en contacto directo con la circulación materna, los cuales son los determinantes de las células citotóxicas. Sin embargo, los antígenos de la Clase II están ausentes.

La unidad feto materna murina, tiende a estimular en la mayoría de los casos una respuesta inmune humoral, no citotóxica frente a los aloantígenos fetales de origen paterno. Esta respuesta consiste fundamentalmente en anticuerpos de la subclase IgG1 (44), caracterizados porque no fijan complemento. Estos anticuerpos reducirían la expresión fenotípica de los antígenos fetales, lo cual podría estar relacionado con una influencia inmunoreguladora de las células B maternas. Algunos autores, han observado que durante el embarazo hay un incremento de células B (45),(46), que podría predisponer a la madre a sintetizar anticuerpos bloqueantes que conducirían a aceptar el feto alogénico (47). Sin embargo, hay datos en contra de la necesaria involucración de los anticuerpos en la protección fetal. Este es el caso de las mujeres afectadas de agammaglobulinemia que han tenido

embarazos satisfactorios. Si los anticuerpos bloqueantes son esenciales para la supervivencia fetal, tales embarazos hubieran sido imposibles.

Por otro lado, el trofoblasto posee una actividad inmunoabsorbente. En él existen receptores para el Fc de la IgG que es transferida a través de la placenta y forma complejos inmunes con los antígenos fetales. Estos inmunocomplejos serían digeridos por los macrófagos o también pueden ser atrapados por las células endoteliales que contienen Clq, que precipita los complejos inmunes de la sangre "in vitro" y posiblemente "in vivo". La actividad bloqueante de los complejos inmunes, puede actuar en las fases inductora y efectora de la respuesta inmune humoral y celular. La interacción de los complejos inmunes con los receptores Fc, conduce a una supresión no específica. Si además, los determinantes antigénicos interaccionan con los receptores específicos de las células, se induce una supresión antígeno específica. A nivel efector, se puede producir un bloqueo de la citotoxicidad mediada por células, retraso de las reacciones de hipersensibilidad etc...Así que la placenta podría tener un papel inmunodesviante dirigiendo el sistema inmune materno hacia una reacción supresora en vez de citotóxica contra los antígenos paternos. Sin embargo recientemente, algunos autores señalan la ausencia de sensibilización o supresión celular materna hacia los antígenos HLA fetales (paternos), señalando la posible existencia de un factor bloqueante que actuaría previniendo el desarrollo de la respuesta inmune de la mujer gestante (48).

La opinión mas generalizada expone, que el feto es inmunogénico y la madre reacciona moderadamente produciendo anticuerpos antifetales desde el comienzo del embarazo, los cuales llegan a la placenta pero no dañan al feto (49).

1.2.2.3 INMUNOCOMPETENCIA INMUNOLOGICA MATERNA

Debido a los cambios fisiológicos y endocrinos que tienen lugar durante el embarazo (50),(51), varios investigadores han propuesto la existencia de un descenso en la reactividad inmune materna como consecuencia de una alterada respuesta de los linfocitos de la madre producida por un incremento en la síntesis hormonal, por la existencia de proteínas del plasma asociadas al embarazo o también debido a un incremento de las células supresoras.

Las microvellosidades del sincitiotrofoblasto, están en contacto directo con la circulación sanguínea materna. Con el tiempo, estas vellosidades se fragmentan y se introducen en la circulación materna, por lo que la madre está recibiendo continuamente tejido alogénico. Además en la circulación sanguínea de la madre, se han encontrado antígenos del sincitiotrofoblasto placentario (52).

Los datos en cuanto a la reactividad de los linfocitos durante el embarazo, son muy contradictorios. La Tabla 1, muestra los resultados obtenidos por distintos autores.

Hay una clara evidencia de que durante el embarazo tiene lugar una respuesta inmune celular específica, representada por las células T supresoras, las cuales se producen fundamentalmente en los ganglios linfáticos paraaórticos que drenan el útero. También se ha encontrado una actividad supresora soluble en estos ganglios, efectuada por una sustancia cuyo Pm es 25.000 D, que no ha sido del todo caracterizada (66). Esta inmunoregulación local, puede estar facilitada a su vez por agentes inmunosupresores producidos por el feto, tales como Alfa-fetoproteína.

En el bazo de la ratona preñada, se han encontrado dos tipos de células T supresoras, capaces de inhibir la respuesta en el cultivo mixto de linfocitos entre células de origen paterno y células maternas.

Unas eran mitomicina resistentes y activas en la fase inductiva del cultivo mixto y las otras eran mitomicina sensibles y activas solo cuando eran añadidas durante la fase proliferativa (67). Ambas poblaciones son Thy+, LyT1-2+, Ia+. Ambas pueden actuar a través de factores solubles o impidiendo la generación de células citotóxicas, reactivas contra los aloantígenos paternos. Este hecho explicaría la ausencia de las células citotóxicas en el ambiente neonatal, lo cual es de gran importancia en el mantenimiento fetal, dada su gran predilección por los antígenos embrionarios. Otra explicación alternativa es que las células citotóxicas, estén saturadas de antígenos fetales y se expresen solo cuando estos antígenos declinen.

T A B L A 1 RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS MATERNOS DURANTE LA GESTACION

<u>PRUEBA INMUNOLOGICA</u>	<u> ESPECIE</u>	<u> EFECTO DEL EMBARAZO</u>	<u> REFERENCIA</u>

ESTIMULACION CON PHA	HUMANA	DISMINUIDA	(47), (53), (54)
"	"	SIN EFECTO	(55), (56), (57)
"	MURINA	DISMINUIDA	(58)
ESTIMULACION EN CULTIVOS MIXTOS	HUMANA	DISMINUIDA	(59)
"	"	SIN EFECTO	(55), (56), (57), (60)
"	MURINA	DISMINUIDA	(61)
CELULAS FORMADORAS DE PLACAS	MURINA	DISMINUIDA	(62)
"	"	AUMENTADA	(61)
INJERTOS DE PIEL	HUMANA	LARGA SUPERVIVENCIA	(63)
ROSETAS ESPONTANEAS	HUMANA	SIN EFECTO	(64)
SUSCEPTIBILIDAD A LAS INFECCIONES VIRALES	HUMANA	AUMENTADA	(65)

1.2.2.4 TOLERANCIA INMUNOLOGICA DE LA MADRE PARA EL FETO

Durante el embarazo, no existe tolerancia en el sentido estricto de un estado específico no reactivo, ya que la madre es capaz de producir anticuerpos contra antígenos fetales de origen paterno. Además, usualmente rechaza injertos heterotópicos de tejido de su propio feto.

1.2.2.5 BARRERA ANATOMICA PLACENTARIA

El feto es antigénico y la capacidad de la madre para responder inmunológicamente, no está drásticamente disminuída durante el embarazo. Parece razonable que el rechazo del feto por la madre sea evitado por la barrera interpuesta entre ambos, prohibiendo el paso aferente de los antígenos fetales en forma soluble o celular hacia la madre, por lo tanto el feto no sufriría ataque inmunológico porque la madre no ha sido sensibilizada.0 no permitiendo el paso eferente de los anticuerpos solubles o células efectoras hacia el feto

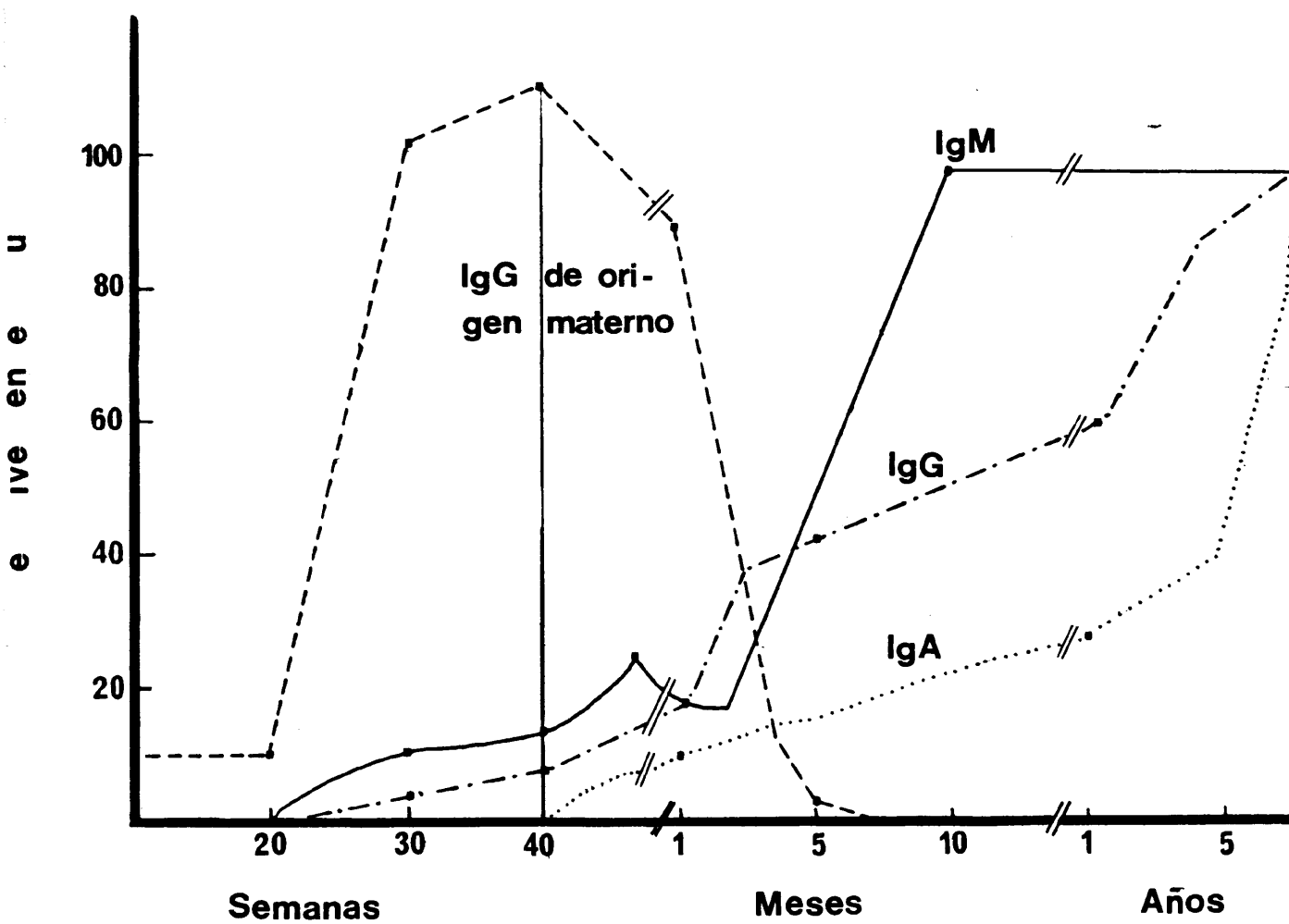
La barrera feto materna, estaría representada por el trofoblasto, que es el paso intermedio entre los tejidos fetales y maternos (68),(69).

Sin embargo, los anticuerpos maternos entran en el feto libremente. La sangre del cordón umbilical del feto humano, contiene altos niveles de las cuatro subclases de IgG, que es la única inmunoglobulina que atraviesa la placenta. Las concentraciones halladas, están estrechamente correlacionadas con las presentes en la circulación de la madre, lo cual sugiere que los anticuerpos son predominantemente de origen materno. El mecanismo de transferencia es por pinocitosis y la transmisión comienza hacia la décima semana de gestación, alcanzando el máximo poco antes del nacimiento(51)Figura I.

Sin embargo los anticuerpos antifetales, salvo raras excepciones, no suelen ser detectables en la circulación fetal, probablemente la entrada podría ser seguida de una rápida absorción por las células fetales.

FIGURA I

Niveles sericos de inmunoglobulina fetal, neonatal
e infantil



Datos tomados de HOLBOROW REEVES 1977. (51).

La circulación fetal, también tiene pequeñas cantidades de IgM sintetizada por el feto. Solo en casos de infección intrauterina, la producción de IgM alcanza niveles muy elevados.

Por otro lado, también los leucocitos fetales y maternos atraviesan la barrera placentaria. De hecho, se pueden detectar células con cariotipo XY de un feto masculino en la circulación materna y viceversa.

Los eritrocitos fetales y maternos pueden ser transferidos, aunque la entrada en el feto de las células maternas es poco común y su supervivencia es breve.

Por lo tanto, la placenta no es una barrera anatómica selectiva, porque hay tráfico molecular y celular en ambas direcciones.

Sin embargo, la placenta tiene una configuración molecular y celular muy especial. Superficialmente, el trofoblasto posee una gruesa capa de glicoproteínas, muy ricas en ácido siálico y neuramínico, lo cual le confiere una alta carga negativa a la superficie celular. Los linfocitos maternos, también están cargados negativamente durante la gestación, de modo que las células son repelidas electrostáticamente por la superficie placentaria (70). Por otro lado, el trofoblasto está formado por una capa celular continua, con sólidas uniones intercelulares.

Parece por lo tanto probable, que la placenta y las transacciones que tienen lugar en ella, sean cruciales para la supervivencia del feto antigénicamente extraño.

1.2.3 HORMONAS Y PROTEINAS ASOCIADAS AL EMBARAZO

La madre está sensibilizada a los antígenos fetoplacentarios y aunque se ha demostrado que puede desarrollar una respuesta potencial contra el feto, debe de existir un bloqueo en el reconocimiento fetal o en la etapa efectora, que evite la consiguiente reacción inmune. La existencia

en el suero de mujeres gestantes, de sustancias capaces de realizar inmunoregulación específica y no específica, podría constituir la explicación a este fenómeno.

1.2.3.1 ESTEROIDES

Los esteroides, pueden ejercer una profunda influencia sobre la reactividad inmunológica femenina. Muchos autores han intentado correlacionar el incremento del nivel de esteroides durante el embarazo, con la regulación inmune materna. Así, la progesterona añadida a concentraciones fisiológicas en cultivos de linfocitos "in vitro", produce un aumento significativo de la población de células supresoras estimuladas con Con A (71). Sin embargo, otros autores señalan que los niveles de esteroides presentes en el suero y en la placenta, son demasiado bajos para tener un efecto directo sobre los linfocitos (72),(73). Todos los esteroides tienen propiedades inmunosupresoras "in vitro" (74), pero el grado de inhibición no se correlaciona con el contenido hormonal y la concentración requerida es muy superior a la presente en la circulación sanguínea materna. Por esta razón, se ha sugerido que los esteroides pueden afectar indirectamente a la respuesta inmune induciendo al timo a producir factores o células inmuno reguladoras (75).

Finalmente dado que la concentración local de estas hormonas en el trofoblasto, es muy elevada, podrían tener un efecto inmuno supresor en la protección fetal (76).

1.2.3.2 GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG)

Es una glicoproteína con gran contenido en ácido siálico, sintetizada en la placenta. Los niveles máximos se alcanzan en el primer trimestre 160UI/ml, descendiendo posteriormente durante el resto del embarazo.

La Gonadotropina coriónica tiene un papel inmunoprotector

debido a que confiere carga negativa a la superficie placentaria e impide la interacción celular. Los resultados obtenidos en cuanto a su papel inmunoregulator, son altamente contradictorios. La HCG inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos estimulados con PHA (77), e inyectada diariamente prolonga los injertos de piel (78). Por el contrario, algunos autores afirman que la HCG, altamente purificada, no tiene capacidad inmunosupresora y los resultados de inhibición "in vitro" pueden ser debidos a las altas concentraciones, no fisiológicas, empleadas (79). Estos investigadores señalan que las propiedades hormonales e inmunosupresoras pueden ser separadas cromatográficamente, indicando que el factor activo tiene un Pm aproximado de 23.000 D y es responsable de la inhibición de la respuesta inducida por mitógenos y antígenos. Además suprime la producción de anticuerpos y retrasa la reacción de hipersensibilidad "in vitro". Sin embargo, otros autores (80) han demostrado que las preparaciones de HCG altamente purificadas incrementan la síntesis de DNA en células no estimuladas y han propuesto que la HCG sea un activador de células B.

1.2.2.3 LACTOGENO PLACENTARIO HUMANO (HPL)

El sincitiotrofoblasto también produce otra hormona característica, denominada lactógeno placentario (HPL) o somatotropina (HCS). Está involucrada en el control del crecimiento fetal y en el metabolismo materno así como en la preparación de las glándulas mamarias para la lactancia.

Algunos autores han obtenido supresión de la proliferación de linfocitos "in vitro", mediante la preincubación con 1.000µg/ml de HPL. Sin embargo, esta dosis es excesivamente elevada, en comparación con los niveles normalmente presentes en el suero de mujeres embarazadas (10µg/ml) y en la placenta (200µg/ml), las cuales son concentraciones inadecuadas para inhibir la respuesta proliferativa.

1.2.3.4 TRANSCORTINA

Alcanza altos niveles durante el embarazo, debido al incremento de síntesis en el hígado, bajo la influencia de los estrógenos. Se distribuye en la circulación sanguínea y en la placenta. La transcortina placentaria puede bloquear la respuesta "in vitro" de linfocitos maternos estimulados con PHA y es más potente que la transcortina del plasma. Por medio de su afinidad para el cortisol, la transcortina placentaria, puede suplementar otros mecanismos inmunosupresores locales (81).

1.2.3.5 TRANSFERRINA

En el trofoblasto, existen receptores específicos para la transferrina, cuya función es atender a las demandas de hierro para el desarrollo fetal. La unión de la transferrina a la superficie del sincitiotrofoblasto puede tener un efecto protector local contra la respuesta inmune materna, ya que los linfocitos en la vecindad de la placenta pueden ser afectados por la carencia de hierro. En ausencia de transferrina, la división de los linfocitos maternos, se dificulta acumulándose en fase G1 y solo proceden a la fase S, cuando tienen transferrina disponible (82).

1.2.3.6 FACTOR TEMPRANO DEL EMBARAZO (EPF)

Tiene un Pm de 200.000 D. Aparece seis horas después de la concepción y permanece en la circulación durante el primer trimestre. Se ha demostrado "in vitro" su capacidad inhibitoria de varias de las funciones de los linfocitos T, por lo cual puede tener un importante papel en la protección temprana de la unidad feto materna (83).

1.2.3.7 β 1 GLICOPROTEINA ESPECIFICA DEL EMBARAZO (PS β 1G)

Es sintetizada por las células del sincitiotrofoblasto a lo largo de todo el embarazo. Su Pm aproximado es 90.000 D. Al final de la gestación, se alcanza la concentración máxima de 300 μ g/ml. Esta proteína

inhibe la transformación de linfocitos "in vitro" estimulados con PHA, sin embargo no suprime la respuesta de linfocitos incubados con Con A. Los datos son contradictorios, ya que algunos autores indican que PS β 1G, produce solo un pequeño descenso en la respuesta de los linfocitos estimulados con PHA y que este efecto no es dosis dependiente. Solo concentraciones superiores a 1000 μ g/ml de PS β 1G inhiben la respuesta linfocitaria y esta concentración se encuentra muy por encima de los niveles fisiológicos. Sin embargo la PS β 1G podría tener predominantemente una acción local en el mantenimiento fetal.

1.2.3.8 α 2-GLICOPROTEINA ASOCIADA AL EMBARAZO α 2-PAG

Es una macroglobulina de 370.000 D de Pm que se encuentra en los sueros de sujetos normales entre 0.1 y 13 μ g/ml. El nivel en el hombre es mucho menor que en la mujer, cuyas concentraciones aumentan considerablemente durante el embarazo, siendo máximas en el primer trimestre de gestación, donde se alcanzan 1.400 μ g/ml (84). Seis semanas después del parto, el nivel de α 2-PAG es insignificante. También se han encontrado niveles aumentados de esta proteína en tratamientos con esteroides y en pacientes afectados de cáncer.

La α 2-PAG tiene propiedades inmunosupresoras en cultivos mixtos de linfocitos, suprime la proliferación inducida por PHA y Con A, inhibe la formación de rosetas espontáneas y afecta a la movilidad electroforética de los macrófagos (84). Por otro lado, la administración intravenosa de α 2-PAG humana, incrementa la supervivencia de injertos en animales de experimentación. El efecto supresor de esta proteína se reduce cuando se estimulan selectivamente las células B, indicando que la α 2-PAG inhibe preferencialmente la respuesta de linfocitos T (85),(86). El efecto de inhibición máxima, se obtiene con 400 mg/ml de α 2-PAG, concentración considerablemente inferior

que la normalmente presente en el suero de mujeres embarazadas. Estos autores indican la posibilidad de que solo cierto número de células tengan capacidad para unirse a $\alpha 2$ -PAG.

1.2.3.9 B1-MACROGLOBULINA ASOCIADA AL EMBARAZO (B1-PAM)

Solo se encuentra en mujeres gestantes y en pacientes con cáncer ovárico. No tiene efecto sobre la proliferación de linfocitos estimulados con mitógeno, pero algunos autores, indican que podría tener un papel en la inmunoregulación, estimulando la producción de anticuerpos maternos bloqueantes (87).

1.2.3.10 PROTEINA A DEL PLASMA ASOCIADA AL EMBARAZO (PAPP-A)

Es una $\alpha 2$ glicoproteína de 750.000 D de Pm, sintetizada por las células del trofoblasto y presente solo en mujeres embarazadas. Los máximos niveles de síntesis se alcanzan durante el tercer trimestre, descendiendo rápidamente después del parto. Es una proteína incompletamente caracterizada y sobre la que se han realizado pocos estudios. Solo se sabe que inhibe la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos (38),(88).

1.2.3.11 INHIBIDOR DE PROSTAGLANDINA SINTETASA ASOCIADA AL EMBARAZO (PAPSI)

El suero de embarazada, tiene propiedades anti-inflamatorias, modifica la función de los neutrófilos y suprime la liberación de enzimas lisosómicas de los macrófagos. Algunos autores (89), indican que PAPSI es probablemente responsable al menos en parte de la actividad anti-inflamatoria del suero de gestante, lo que supondría que esta proteína estaría implicada en la protección fetal.

Se sintetiza en el trofoblasto durante casi toda la gestación. Los niveles de PAPSI descienden en las últimas etapas del embarazo, lo que coincide naturalmente con el incremento en la síntesis de prostaglandinas.

1.2.3.12 CERULOPLASMINA

Es una proteína sérica, transportadora de cobre, cuya movilidad electroforética es alfa y su peso molecular 132.000 D. Las concentraciones normales en el suero, están comprendidas entre 150 y 600 mg/ml, valores que aumentan en ciertos estados patológicos y también cuando se incrementa el nivel de estrógenos.

1.2.3.13 ALFA₁ GLICOPROTEÍNA ACIDA

También conocida como Orosomucoide. Electroforéticamente, migra en una zona muy próxima a la albúmina. Tiene un peso molecular de 41.000 D y su concentración normal en el suero está comprendida entre 550 y 1.400 mg/ml, valores que aumentan con la administración de estrógenos.

A pesar de todos los factores inmunosupresores que existen en la circulación materna, la madre reacciona satisfactoriamente, rechazando injertos y combatiendo las infecciones que acontezcan durante el embarazo.

De todas las sustancias presentes en el suero de mujeres gestantes, propuestas como factores inmunosupresores, la más interesante es la Alfa fetoproteína, que requiere un estudio más detallado.

1.3 ALFA FETOPROTEÍNA

1.3.1 GENERALIDADES

La circulación fetal, contiene varias proteínas específicas del embrión, presentes normalmente en muy pequeña concentración en el suero de individuos adultos.

Pedersen en 1.944, descubrió la primera proteína de este grupo en el suero de ternera fetal, por lo que la denominó Fetuína. La Alfa fetoproteína, fué descubierta por Bergstrand y Czar en 1.956 (90), en el suero fetal humano. Por emigrar electroforéticamente entre la albúmina y la alfa globulina, la denominaron Alfa fetoproteína (AFP). Este descubrimiento fué confirmado en el mismo año por Halbrecht y Klibanski (91).

Es la primera alfa globulina que aparece en el suero de los mamíferos durante el desarrollo ontogénico, siendo la proteína sérica dominante en la primera fase de la vida embrionaria, donde supera los niveles de la albúmina y transferrina. Su reaparición en la vida adulta con concentraciones por encima de 10ng/ml, está asociada con la presencia de tumores, principalmente hepatomas, tumores de células embrionarias (94),(95) y enfermedades de hígado asociadas a regeneración intensa de tejido hepático.

1.3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS

Es una glicoproteína de Pm comprendido entre 64.000 y 70.000 D (94),(95),(96). Consta de una única cadena polipeptídica (97). Su coeficien_

ciente de sedimentación es 4-5 S (98). El coeficiente de extinción a 278 nm es 5,30 para la AFP procedente de suero fetal y 5,26 para la AFP presente en sueros de pacientes con cáncer hepático (94). La constante de difusión es 6,18 cm/seg. Su volumen parcial específico es 0,726 ml/g (99). El punto isoeléctrico, está comprendido entre 4,7 y 5,0 (98). El contenido en carbohidratos es aproximadamente del 4% con dos residuos de ácido siálico por molécula de proteína (94),(96).

La AFP, aunque homogénea por muchos criterios, se presenta en varias formas o isoproteínas con distintas cargas netas (100). Esta microheterogeneidad, no es debida solamente a su contenido en ácido siálico, sino que también depende del anclaje no covalente con otras moléculas de pequeño Pm y de las distintas formas estructurales de la proteína. Hasta el momento, se han identificado 5 isoproteínas de AFP, dependiendo del método de aislamiento y purificación (101), (102).

La AFP procedente de suero fetal y suero de enfermos con hepatoma, son similares, tanto en su composición de aminoácidos y contenido en carbohidratos, como electroforética y antigénicamente (103) TABLAS 2 y 3.

Las AFPs de mamíferos, tienen todas una estructura química y antigénica similar. Sus características de Pm y composición de aminoácidos, aunque similares presentan algunas diferencias de especie. TABLA 4

1.3.3 SINTESIS Y NIVELES DE AFP

La AFP es sintetizada por el feto, principalmente en el hígado fetal y en el saco vitelino (104). Pequeñas cantidades son detectadas por inmunoradiografía en cultivos de tejido gastrointestinal fetal, placenta y riñón (105),(106),(107),(108).

En humanos, los primeros esbozos del hígado, aparecen dieciocho días después de la concepción y once días más tarde, se puede detectar

T A B L A 2

COMPARACION DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA

ALFA-FETOPROTEINA FETAL (AFP-F) Y ALFA-FETOPROTEINA PRESENTEEN PACIENTES DE CANCER HEPATICO (AFP-H) *

<u>AMINOACIDOS</u>	<u>AFP-F</u>	<u>AFP-H</u>
	<u>moles/mol</u>	<u>moles/mol</u>
Asp	43	43
Thr	36	34
Ser	38	35
Glu	84	96
Pro	21	21
Gly	24	26
Ala	47	45
Cys	28	28
Val	29	28
Met	7	8
Ile	30	28
Leu	53	51
Tyr	17	15
Phe	29	25
Trp	1	2
Lys	36	39
His	14	15
Arg	18	20
<u>total</u>	<u>559</u>	<u>559</u>

* Datos tomados de Y. Aoyagi y col. (1978). Scandinavian J. Immunol. 8. Suppl. 8,385-389.

T A B L A 3 COMPARACION DE LA COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS ENTRE LA ALFA-FETOPROTEINA FETAL (AFP-F) Y DE

HEPATOMA (AFP-H), moles/mol. *

<u>CARBOHIDRATOS</u>	<u>AFP-F</u>	<u>AFP-H</u>
Manosa	4,5	3,5
Galactosa	3,1	2,9
Glucosa	1,9	3,3
N-Acetil glucosamina	3,0	5,1
Acido Siálico	1,5	2,2
total.....	14	17

(*) Datos tomados de Y. Aoyagi y col. (1978). Scandinavian
J. Immunol. 8. Suppl. 8, 385-389.

T A B L A 4 **COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE ALFA FETOPROTEINA ***

A M I N O A C I D O	FUENTE DE ALFA FETOPROTEINA			
	H U M A N A	P E R R O	R A T A	R A T O N
Asp	74	75	91	78
Thr	56	52	49	48
Ser	54	75	57	81
Glu	184	162	154	159
Pro	43	63	48	47
Gly	49	54	46	49
Ala	84	78	87	75
Cys	48	37	51	58
Val	45	51	40	41
Met	12	9	21	19
Ile	48	47	46	51
Leu	94	89	99	101
Tyr	26	29	23	18
Phe	47	43	38	40
Lys	72	68	81	76
His	26	22	32	23
Arg	35	43	35	33
Trp	3	3	2	3

* = moles/1.000 moles
 Datos tomados de Watabe H. (1974) Int. J. Cancer 13,377-388

por inmunofluorescencia, cantidades apreciables de AFP en los hepatocitos fetales (105),(108). El hígado fetal, entre la decimocuarta y vigésima semanas de gestación, produce a razón de 19-26 $\mu\text{g}/\text{minuto}$ de AFP (109).

La síntesis de AFP en el saco vitelino, comienza treinta y cinco días después de la fertilización, siendo máxima a la octava semana, a partir de la cual, comienza a decrecer.

En la decimocuarta semana gestacional, el suero fetal contiene 3mg/ml de AFP, concentración que decrece posteriormente a medida que progresa el embarazo (110). La AFP en el líquido amniótico, sigue el mismo patrón temporal que en el suero fetal FIGURA II. En el momento de nacer, el individuo tiene aproximadamente 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, permaneciendo así durante la primera semana de vida, a partir de entonces, disminuye hasta el nivel que mantendrá durante el resto de la vida (2-10ng/ml)

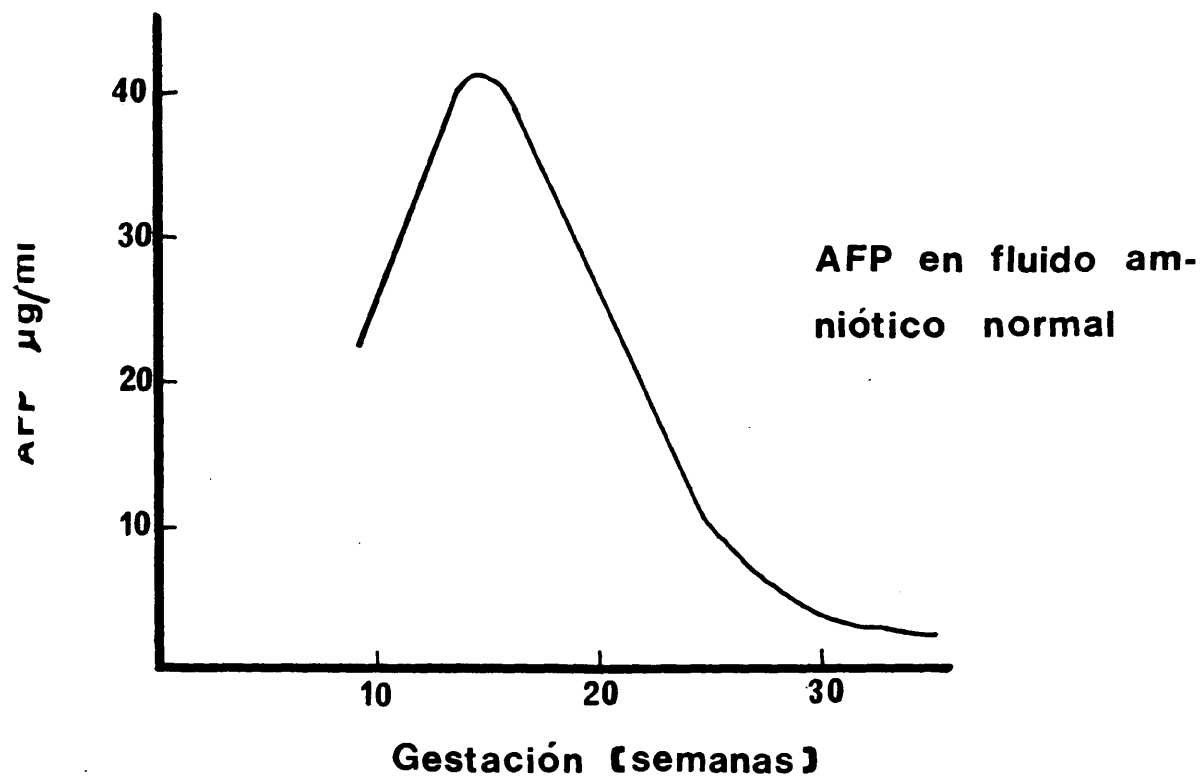
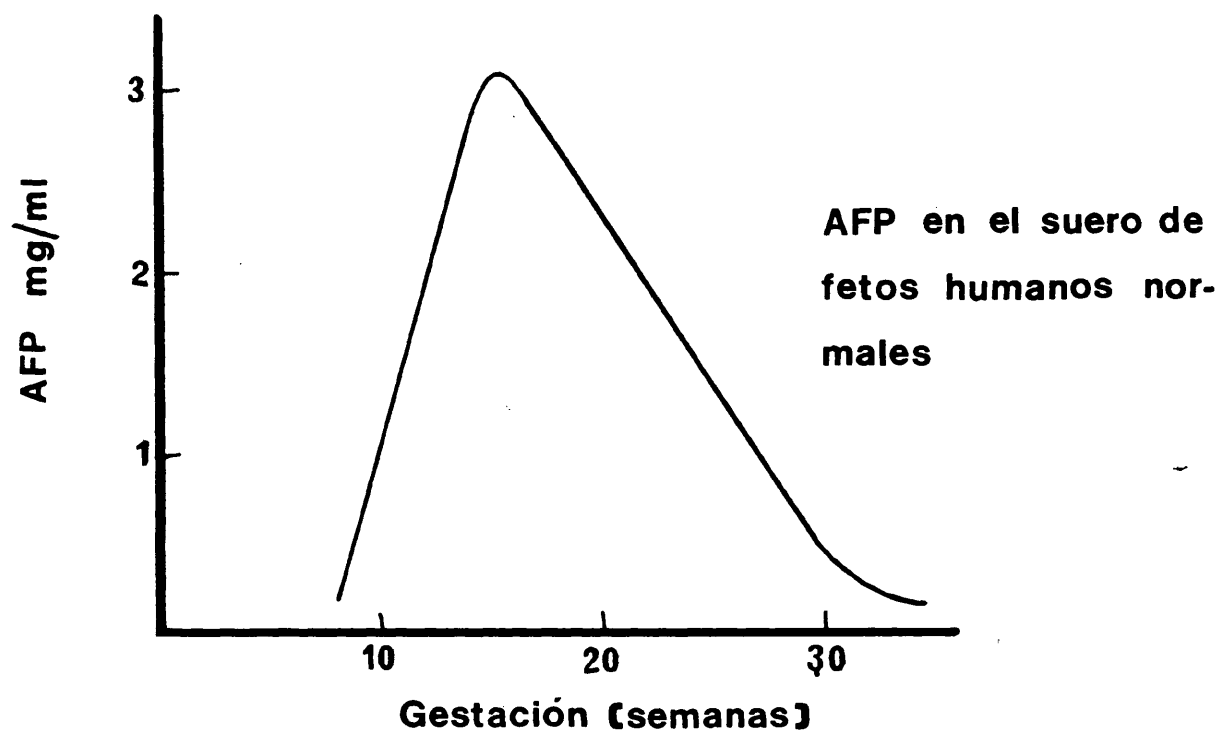
Los niveles de AFP en el suero materno, aumentan a medida que progresa la gestación, llegando a un máximo a las treinta y dos semanas. Posteriormente comienza a decaer, experimentando de nuevo un incremento en el momento del parto, por difusión de esta proteína a través de la placenta.

La concentración de AFP en adultos sanos, varía de unos sujetos a otros y también según el método empleado para su determinación. En nuestro laboratorio, las concentraciones por Radioinmunoensayo, oscilan como indica la TABLA 5. Los datos recogidos según otros autores se muestran en la TABLA 6.

1.3.4 IMPLICACIONES CLINICAS DE LA AFP

La AFP, constituye un parámetro clínico importante en la investigación del cáncer y de la fisiopatología fetal.

FIGURA II



Datos tomados de Z.A.HABIB 1977. (110).

T A B L A 5

NIVELES DE AFP EN SUJETOS ADULTOS NORMALES

<u>SUERO</u>	<u>CONCENTRACION DE</u>
	<u>AFP (ng/ml)</u>

1	4,8
2	5,4
3	6,4
4	6,2
5	2,9
8	17,0
9	4,2
10	4,0
11	5,6
12	2,8
13	3,1
14	4,4
15	5,6
16	5,6
17	3,3
20	3,4
22	4,5
23	5,0
24	6,2
29	1,6
41	2,8

nº total de casos = 21

media \pm error estandar= 4,99 \pm 0,65

datos tomados de C.E.RODA. Tesina 1979. Facultad de Biológicas.
 Universidad Complutense de Madrid.

T A B L A 6 MEDIA DE LOS NIVELES DE ALFA FETOPROTEINA EN SUJETOS ADULTOS NORMALES

<u>Nº DE CASOS</u>	<u>MEDIA DE LOS NIVELES DE</u>	<u>DESVIACION ESTANDAR</u>	<u>REFERENCIA</u>
32	7,6	1-16,5	Rouslahti y Seppala, 1.971
105	2,3	1,2	Chayvialle y Ganguli, 1.973
192	2,6	1,6	Masseyeff y cols., 1.974

Una concentración de AFP por encima de los valores normales descritos, es síntoma de enfermedad. En enfermedades malignas, los valores elevados de AFP, se dan principalmente en hepatomas, teratocarcinomas y también en algunas enfermedades gastrointestinales (111).

Valores moderadamente elevados de AFP en sangre comprendidos entre 250-500 ng/ml, se hallan especialmente en enfermedades de hígado, asociadas a regeneración de tejido hepático (112), en pacientes con atáxia-te_langiectásica (113), en enfermos de tirosinosis (114) y en pacientes con fibrosis quística (115).

La presencia de niveles excesivos de AFP en el suero materno y en el líquido amniótico, ha servido de gran ayuda en el diagnóstico prenatal. Así, niveles aumentados de AFP en el suero materno y en el líquido amniótico están relacionados con :

- I - Distrófias neurales; es decir malformaciones por falta de cierre o cierre incompleto del tubo neural, que desembocan en espina bífida, anencefalia o hidrocefalia.

- II - Otras anomalías congénitas: atresia congénita esofágica o duodenal. Abortos espontáneos de fetos 45 XO. Teratoma sacrocoxígeo y Nefrosis congénita.

- III - Condiciones ginecológicas: en casos de isoinmunización RH diabetes durante el embarazo, muerte intrauterina, aborto espontáneo por diversas causas y gestación múltiple.

Por otro lado, la ausencia o disminución de AFP en líquido amniótico, está asociada a toxemia.

Los niveles anormales en el suero materno, pueden indicar: disfunción de la placenta, patología del hígado materno, quiste hidatídico, coriocarcinoma, hepatitis viral, cáncer hepático y alteraciones del feto

o relacionadas con el mismo.

1.3.5 CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LA AFP

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre AFP, se conoce muy poco acerca de su función biológica.

Un hecho que llamó la atención es la gran homología en la secuencia de aminoácidos entre la albúmina y al AFP (116),(117), que además pueden tener reacción cruzada, previa modificación química (118). Todo ello hizo suponer que ambas proteínas tenían un gen ancestral común y que la AFP desempeñaba el papel de albúmina fetal, ya que su concentración en el suero fetal, está en razón inversa a la concentración de la albúmina.

Según Grande Covián, la seroalbúmina se une a los ácidos grasos, no esterificados, de cadena corta presentes en la sangre. Sin embargo, la AFP se une no covalentemente a ácidos grasos libres de más de veintidós átomos de carbono. Precisamente, parece que son estos ácidos grasos de cadena larga, los requeridos en la formación del sistema nervioso fetal. por lo que las altas concentraciones de AFP durante el periodo embrionario, serían debidas a su función como proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga utilizados para la formación y el desarrollo del sistema nervioso.

Por otro lado, debido a la capacidad de unión de la AFP a los estrógenos, se consideró proteína transportadora de hormonas. Algunos autores demostraron en la rata una alta capacidad de unión de la AFP para el estradiol y estrona, pero no para estriol, progesterona, testosterona o cortisona (119).

La situación en el hombre está menos clara, no habiéndose confirmado que la AFP humana tenga afinidad para los estrógenos (108).

Otro autores demostraron que la AFP murina, deprimía la respuesta

de anticuerpos, tanto primaria como secundaria y tenía acción inhibidora de la transformación blástica inducida por mitógenos y en cultivos mixtos de linfocitos (120). El efecto supresor de esta proteína, se explicaba postulando la existencia de interacciones físicas mediante la formación de complejos entre la AFP y la PHA (121). Sin embargo, posteriormente se demostró que la AFP inhibía la transformación blástica inducida por otros mitógenos y que el proceso inhibitorio no era debido a la unión e interferencia con la lectina (122).

Algunos autores, señalaron la existencia de receptores específicos para la AFP, en la superficie de linfocitos T (123), lo cual indicaba que la AFP actuaría directamente sobre la célula. Sin embargo otros investigadores indicaron que la asociación entre el linfocito y la AFP era de baja afinidad puesto que podía ser disociada por simple lavado (124). Simultáneamente se demostró que el líquido amniótico suprimía la respuesta de linfocitos murinos de bazo al estímulo antigénico con hematíes de carnero, señalando que la AFP podría ser la responsable de dicha supresión (125).

De acuerdo con estos hallazgos, se ha sugerido que la AFP podría tener una función biológica capital en el curso de la vida fetal (126), ayudando al mantenimiento del feto como un injerto homólogo en un medio ambiente genéticamente incompatible.

2-OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El embarazo implica la coexistencia parabiótica, entre la madre, inmunológicamente activa y un feto semialogénico e inmaduro desde el punto de vista inmunológico. La naturaleza de la respuesta inmune materna hacia los antígenos fetales de origen paterno y la capacidad del feto para sobrevivir en un medio ambiente genéticamente incompatible, son dos hechos de carácter enigmático.

Entre los variados cambios fisiológicos que acontecen durante el embarazo, es notorio, el aumento del nivel circulante de una serie de proteínas, entre las que cabe señalar la Alfa-fetoproteína (AFP), que es la primera alfa globulina que aparece en el suero durante el desarrollo ontogénico, siendo su concentración durante la gestación muy superior a otras proteínas séricas. A pesar de los numerosos trabajos publicados, se desconoce su función biológica, ya que los datos presentes en la literatura son altamente contradictorios (127),(128),(129),(130),(101),(131),(132),(133), (134). La opinión más generalizada es que la AFP posee actividad inmunoreguladora, por lo que podría ejercer una función importante en el mantenimiento del feto intraútero.

Planteando el posible papel inmunoregulador desempeñado por la AFP, por otros factores séricos específicos del embarazo o por ambos, el objetivo de este trabajo ha sido: Estudiar el efecto producido por los componentes del suero de mujeres gestantes sobre poblaciones linfocitarias "in vitro". Por lo que el desarrollo de la investigación fué:

2.1 Estudio del efecto del suero completo de mujeres gestantes, sobre la respuesta proliferativa de linfocitos estimulados mitogénicamente.

2.2 Análisis de la respuesta de cocultivos de linfocitos T y B en presencia de sueros de mujeres embarazadas para detectar hacia que población linfocitaria está dirigido dicho efecto.

2.3 Aislamiento y purificación de AFP a partir de suero fetal humano, con el fin de realizar un estudio de dosis respuesta, con distintas concentraciones de AFP, en cultivos de linfocitos T estimulados mitogénicamente.

2.4 Estudio en paralelo de sueros de gestantes completo y desprovisto de AFP respectivamente, con objeto de averiguar si el efecto producido es motivado por la AFP o por otros factores presentes en el suero.

2.5 Localización del factor o factores presentes en sueros de mujeres embarazadas, responsables de la inhibición de la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA.

2.6 Por último, se estudió la posible existencia de una cooperación entre la AFP y la fracción inhibitoria del suero de gestantes sin AFP, en el fenómeno de inhibición de la proliferación de linfocitos T.

3-MATERIALES Y METODOS

3.1 SOLUCIONES MAS UTILIZADAS

3.1.1 SOLUCION SALINA 0,15 M pH 7,2

NaCl.....	8,77 g
Tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,5 M.....	20,00 ml
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	69,40 g
- KH_2PO_4	15,00 g
- H_2O destilada hasta	1,00 l
Completar con H_2O destilada hasta	1,00 l

3.1.2 SOLUCION DE HANK

SOLUCION A

a)NaCl.....	80 g
KCl	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 g
H_2O destilada.....	1 l
b) CaCl_2	1,4g
H_2O destilada.....	50 ml

Mezclar a y b y completar hasta 500 ml con H_2O destilada

SOLUCION B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,52 g
KH_2PO_4	0,60 g
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	10 g
H_2O destilada hasta	500 ml

SOLUCION C

NaHCO_3	1,4 g
H_2O destilada hasta	100 ml

Para su uso: mezclar un volumen de Solución A con un volumen de Solución B y 18 volúmenes de H_2O destilada. Añadir 1 ml de Solución C por cada

40 ml de la mezcla anterior.

3.1.3 MEDIO DE CULTIVO ENRIQUECIDO

RPMI 1.640 (Flow).....	100 ml
Gentamicina (Flow) 1/10	1 ml
L-Glutamina (Flow) 2mM	1 ml

3.1.4 SOLUCION DE AZUL TRIPAN

Azul Tripán (Merk) al 2% en H₂O destilada

NaCl al 4,5%

Se mezclan 4 partes de Azul Tripán por cada una de NaCl.

3.1.5 LIQUIDO DE CENTELLEO

Tolueno (Searle).....	1 l
2,5 difenil-oxazol (PPO).....	4 g
1,4-Di(2-(5-feniloxazol)benceno)(POPOP)...	0,05g

3.1.6 SOLUCION DE LISIS DE HEMATIES

NH ₄ Cl	8,29 g
KHCO ₃	1,00 g
EDTA ácido	0,02 g
H ₂ O destilada	100 ml

Ajustar el pH a 7,4 y para su uso diluir a 1/10 en H₂O destilada.

3.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ALFA-FETOPROTEINA HUMANA

3.2.1 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

La Alfa-fetoproteína humana (AFP), fué aislada a partir de suero fetal humano, obtenido de una mezcla de sangre de cordón umbilical según el método descrito por Pagé (135).

Veinte mililitros de suero fetal humano, se aplican a 10g de DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chem.), previamente hinchados con una solución tamponada de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M pH 7. Se mantiene en agitación lenta durante 20 minutos y a continuación se vierte la mezcla en un Buchner al que se ha acoplado un doble filtro de papel (Whatman 1) y se hace pasar por gravedad a través del gel las siguientes soluciones con distintos pHs: 250ml de tampón de equilibrado pH7, 500ml de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M pH5,5 y 500ml de solución $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M a pH5. Las proteínas eluidas a estos pHs, son despreciadas y se procede a recoger las retenidas en el gel, las cuales eluyen con 250ml de tampón HAc/NaAc 0,1 M pH4, conteniendo NaCl 2M. Dichas proteínas equivalen al 25% del contenido protéico del suero. Finalmente, se concentra el eluido por ultrafiltración, presión negativa, hasta 10ml en cámara fría.

3.2.2 FILTRACION A TRAVES DE SEPHADEX G-25

Una columna de Pharmacia K16/70, se rellena con 25g de Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chem.) equilibrado con tampon HAc/NaAc 0,1M pH6 conteniendo NaCl 1M, CaCl_2 10^{-3} M, MgCl_2 10^{-3} M y MnCl_2 10^{-3} M. A continuación, se aplican 10ml del concentrado obtenido en el apartado anterior y se comienza la elución, con la misma solución empleada para equilibrar el gel. Se recogen fracciones de 2ml con una velocidad de flujo de 8ml/hora. El contenido protéico de cada fracción se mide por absorción de luz ultravioleta a 280nm en un espectrofotómetro (Hitachi Perkin-Elmer Coleman III). Las fracciones

correspondientes al pico excluido, se concentran por ultrafiltración (presión negativa) hasta un volumen de 5ml.

El objeto de este proceso, es equilibrar la muestra con tampón acetato 0,1M pH6 que se utiliza en la siguiente cromatografía.

3.2.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN SEPHAROSA CON A (CONCANAVALLINA A)

En una columna de Pharmacia K16/40, se empaquetan 70ml de Sepharosa Con A (Pharmacia Fine Chem.) equilibrada en tampón HAc/NaAc 0,1M pH6 antes mencionado.

Una vez preparada la columna, se aplica el concentrado protéico, obtenido en el paso anterior y se mantiene a flujo constante de 8ml/hora, recogién dose fracciones de 2ml en un número aproximado de 40. La cantidad de proteína correspondiente a cada fracción, es medida por absorción de luz ultravioleta a 280nm. Cuando los datos de la lectura son prácticamente nulos, se reemplaza el eluyente por alfa-metil glucósido al 2% (p/v) en el tampón de equilibrado, con el fin de desplazar las glicoproteínas unidas a la Concanavalina A, las cuales describen un segundo pico en el perfil de elución. (FIGURA VIII pag.102)

3.2.4 INMUNODIFUSION DOBLE BIDIMENSIONAL

Las distintas fracciones del segundo pico, obtenidas tras la elución con alfa-metil glucósido, son analizadas por inmunodifusión doble bidimensional (136), frente a suero de conejo anti-AFP humana (Operón).

Se procede a aplicar dichas fracciones en los pocillos cortados de un gel de Agar Noble (Difco) al 1% (p/v) en tampón fosfato 0,15M pH7,3. Un pocillo central y equidistante 3mm se rellena con suero anti-AFP. Posteriormente se incuba en cámara húmeda a TA durante 24 horas (FIGURA IX pag. 103).

Simultáneamente, se enfrentan cada una de las fracciones con

suero anti-humano de conejo (Operón), para ver el grado de pureza, observando se varias bandas de precipitación (FIGURA X pag.104).

Las fracciones positivas en AFP se concentran por ultrafiltración, presión negativa hasta 1ml y se dializan en solución salina pH7,2.

Para identificar las proteínas contaminantes, se realiza una inmunoelectroforesis en agar.

3.2.5 INMUNOELECTROFORESIS

Es una combinación de la inmunodifusión en agar doble bidimensional, con la separación electroforética de las proteínas en agar. Estas proteínas pueden ser analizadas sobre la base de sus propiedades antigénicas y electroforéticas.

Se realiza sobre gel de Agar Noble (Difco) al 1,25% disuelto en tampón veronal (ácido 5,5-dietilbarbitúrico 5,5-dietilbarbiturato sódico) convenientemente preparado de 75mm de largo por 40mm de ancho y 2mm de espesor, de fuerza iónica 0,03M y pH8,6.

La muestra se aplica en un orificio de 1mm de diámetro, practicado en el centro del gel, mediante una pipeta Pasteur calibrada y la electroforesis se lleva a cabo en el tampón mencionado anteriormente, aplicando una caída de tensión de 115V y 15mA durante 70 minutos.

Tras la electroforesis, se practicaron dos trincheras de 2mm de ancho, equidistantes 6mm del orificio practicado anteriormente. La trinchera superior se rellena con suero de conejo anti-AFP y la inferior con suero anti-humano de conejo. El gel se deja en reposo en una cámara húmeda a TA observándose el desarrollo de las bandas de precipitación a las 24 y 48 horas. La muestra procesada por los métodos anteriores, contiene AFP, pero también otras proteínas, fundamentalmente de movilidad alfa (FIGURA XI pag.105). Por consiguiente es necesario utilizar métodos de purificación

muy específicos.

3.2.6 OBTENCION DE ALFA-GLOBULINAS HUMANAS

La fracción alfa-globulinica, contaminante principal de la preparación de AFP obtenida de suero fetal humano, se aísla a partir de suero humano normal, sometido a las mismas condiciones que el suero fetal. Primero se procede al fraccionamiento del suero en DEAE Sephadex A-50 con distintos tampones. El eluido a pH4, se equilibra con tampón HAC/NaAc pH6, pasándolo a través de Sephadex G-25 y finalmente se realiza una cromatografía de afinidad en Sepharosa Con A. Aquellas fracciones del segundo pico que eluyen en el mismo lugar que las positivas en AFP, correspondientes al cromatograma de un suero fetal, son recogidas, dializadas en solución salina pH7,2 y concentradas por ultrafiltración, presión negativa, hasta 1ml.

3.2.7 OBTENCION DE ANTI-ALFA-GLOBULINAS HUMANAS DE CONEJO

Se prepara una emulsión a partes iguales (v/v) con 500µg/ml de alfa-globulinas y adyuvante completo de Freund. Se inyectan 0,5ml de la emulsión, via intramuscular, en las patas traseras de conejos de la raza New Zealand a intervalos de dos semanas. Se realizan tres inmunizaciones sucesivas. Siete dias después de la última inyección, se sangran los conejos de la vena marginal de la oreja y se deja retraer el cuágulo durante 6 horas a TA. Se separa el suero y se procede a la obtención de la fracción anti-alfa-globulina, por precipitación con sulfato amónico 2M. Se mezclan volúmenes iguales de suero y sulfato amónico 4M, se incuba a 37°C durante 45 minutos, transcurrido este tiempo, se centrifuga a 2000xg durante 15 minutos a TA. Se desprecia el sobrenadante y se añade de nuevo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2M. El precipitado obtenido tras la centrifugación, se disuelve en solución salina pH7,2 y se dializa en la misma solución, con el fin de eliminar

el sulfato. Una vez dializado, se guarda a -20°C hasta posterior uso.

3.2.8 COLUMNAS DE INMUNOADSORBENTE

Sueros de conejo anti-humano (Operón) o anti-alfa-globulinas, previamente dializados en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{HNaCO}_3$ 0,1M pH8, se acoplan a Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia Fine Chem.).

3.2.8.1 PREPARACION DE INMUNOADSORBENTES

Seis gramos de Sepharosa 4B activada con CNBr, se lavan tres veces con una solución de HCl 0.001M y con tampón carbonato/bicarbonato sódico 0,1M pH8, alternativamente. Posteriormente, se resuspende en 5ml del tampón mencionado anteriormente, conteniendo 180mg de la proteína a complejar. La mezcla, se incuba con agitación suave durante 2 horas a TA o 18 horas a 4°C . A continuación, se filtra en un Buchner y se recoge el eluido, determinando su concentración proteica mediante espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a 280nm (proteína no acoplada).

Posteriormente, se lava el gel repetidamente con tampón carbonato/bicarbonato sódico 0,1M pH8, hasta que la densidad óptica del líquido de lavado recogido sea menor de 0,02.

Para bloquear los grupos activos que se hubieran quedado libres, se incuba la Sepharosa con una solución de etanolamina 1M tamponada con carbonato/bicarbonato 0,1M pH8 durante 2 horas a TA. A continuación, se realizan tres ciclos de lavado, alternando tampones de bajo y alto pH: HAc/NaAc 0,1M pH4 y solución de borato sódico 0,9% (p/v) pH8.

Por último se resuspende el gel en 20ml aproximadamente de solución salina pH7,2 y se procede a empaquetar y equilibrar una columna de 1x20cm.

3.2.8.2 PURIFICACION DE AFP

Las alfa-globulinas contaminantes de las preparaciones de AFP,

obtenidas por Sepharosa Con A, son eliminadas mediante dos inmunoabsorbentes consecutivos. Primero se aplica 1ml de la muestra a una columna de Sepharosa 4B activada con CNBr, equilibrada con solución salina pH7,2, a la cual se le ha acoplado suero de conejo anti-humano (Operón). Las proteínas no unidas (AFP y algunas alfa-globulinas, detectadas por inmunodifusión doble bidimensional con anti-sueros específicos), son concentradas hasta 1ml y se aplican de nuevo a otra columna de Sepharosa 4B activada con CNBr, acoplada con suero de conejo anti-alfa-globulinas humanas. La proteína no unida, AFP, eluye con solución salina pH7,2.

Ambas cromatografías se realizan a un flujo constante de 6ml/hora, recogiendo fracciones de 0,5ml.

Las columnas una vez utilizadas, se reciclan con una solución de Gly/HCl 0,5M pH3, conteniendo NaCl 0,15M para eliminar las proteínas retenidas en el gel. A continuación se equilibra con solución salina pH7,2 para posterior uso.

El grado de pureza de la muestra una vez concentrada, se detecta mediante inmunodifusión doble bidimensional (FIGURA XII pag.106).

La proteína ya purificada, se guarda a -20°C

3.3 DETERMINACION DE ALFA-FETOPROTEINA POR RADIOINMUNOENSAYO

El Radioinmunoensayo (RIA) escogido para nuestro trabajo es de tipo sandwich, utilizando antisuero comercial marcado y discos de papel activado con CNBr (137),(138).

3.3.1 ANTISUERO ANTI-ALFA-FETOPROTEINA

Utilizamos el suministrado por Operón, del que se precipita la fracción gamma con Na_2SO_4 al 18%.

A un mililitro de antisuero, se añaden 1,38ml de Na_2SO_4 al 30,96% (p/v); tras incubar 45 minutos a 37°C, se centrifuga durante 15 minutos a 200xg y TA. Se desprecia el sobrenadante y se añade 1ml de Na_2SO_4 al 18% (p/v), sobre el precipitado. Se agita cuidadosamente y se centrifuga de nuevo a 2.000xg durante 15 minutos. El precipitado es redisolto en 1ml de solución salina pH7,2 y dializado frente a la misma solución, con el fin de eliminar el exceso de Na_2SO_4 . La proteína, se guarda a -20°C hasta posterior uso.

3.3.2 DISCOS DE PAPEL

Veinticinco gramos de CNBr (Scharlau), se disuelven en 150ml de agua destilada, con agitación magnética durante 12 horas. Despreciando los restos insolubles, se añaden 100ml de esta solución a 5g de discos de papel (Whatman 1) de 5mm de diámetro, los cuales se han dejado hinchar previamente, en 50ml de agua destilada. Se mantienen en agitación durante 6 minutos, controlando el pH entre 10 y 11, para lo que se utiliza NaOH 1M. Se aspira el sobrenadante y se lava tres veces con 200ml de NaHCO_3 0.0015M durante 2 minutos. Posteriormente se procede a lavar con 600ml de agua destilada, 600ml de acetona al 50% (v/v) y 600ml de acetona al 100% (v/v), consecutivamente. Todas estas soluciones deben estar frías, para mejorar el curso de la reacción.

Por último, se dejan secar los papeles durante 1 hora a TA y se conservan a -20°C .

3.3.3 ACOPLAMIENTO DE LA PROTEINA A LOS PAPELES

La fracción gamma, obtenida por precipitación de 1ml de suero anti-AFP con Na_2SO_4 al 18% (p/v), se resuspende en 40ml de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,1M pH8 y se incuba con 500mg de papeles activados con CNBr, durante 3 horas a TA, agitando manualmente de vez en cuando. Se lava dos veces con 100ml de tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,1M pH8 durante 10 minutos a TA. Se añaden 100ml de etanolamina 0,05M en el tampón mencionado anteriormente y se incuba de nuevo 3 horas a TA. Posteriormente, se lava dos veces con 100ml de tampón carbonato/bicarbonato sódico 0,1M pH8 y otras dos con 100ml de Gly/HCl 0,1M pH3, incubándolo cada vez, durante 5 minutos. A continuación se lava de nuevo con 100ml de tampón carbonato/bicarbonato sódico 0,1M pH8, dos veces y otras dos con solución salina pH7,2. Seguidamente, los papeles se resuspenden en solución $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,05M pH7,9 conteniendo 0,3% (p/v) de albúmina bovina (Sigma), 0,1%(p/v) de NaN_3 y 0,1% (v/v) de Tween 20 manteniéndose a 4°C hasta su uso.

3.3.4 MARCAJE DE LA PROTEINA CON ^{125}I

Veinte microgramos de la fracción gamma de antisuero anti-AFP (Organon), se marcan con 1mCi de ^{125}I , por el método de la Cloramina T (modificación del método de Greenwood) (139).

Primero, se diluye el ^{125}I con 100 μl de tampón fosfato 0,5M pH7,5 y se añade a la proteína. A continuación, se agregan 100 μl de Cloramina T a la concentración de 1mg/ml, agitándose el tubo durante 1 minuto (tiempo muy crítico). Inmediatamente después, se añaden 100 μl de metabisulfito sódico a la concentración de 1mg/ml. Se incuba durante 3 minutos, se adicionan 0,5ml de solución salina pH7,2 y se dializa frente a la misma solución,

fría. Media hora después, se añade 1ml de albúmina humana (Sigma) a la concentración de 2 mg/ml en solución salina pH7,2. Se continúa dializando en frío, con cambios frecuentes hasta obtener fondo en los líquidos de diálisis, para lo que se toman alícuotas de 100µl y se cuentan en un contador gamma (LKB).

Los resultados obtenidos, se expresan: como el porcentaje de incorporación de ^{125}I a la proteína, dicho porcentaje debe ser superior al 70%;

$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{cpm de la proteína}}{\text{cpm de la proteína} + \text{cpm de las diálisis}} \times 100$$

3.3.5 TECNICA DE RADIOINMUNO-ANALISIS

Se utilizan tubos de poliestireno, en los cuales se introduce un disco de papel de filtro con la proteína acoplada y se añade por duplicado 100µl de las distintas muestras a estudiar.

La curva estandar, se realiza diluyendo en serie, una preparación de AFP comercial, de concentración conocida (Biodata 400ng/ml) en suero de caballo (Flow) previamente diluido $\frac{1}{2}$ en solución salina tamponada con fosfato 0,005M pH7,4, conteniendo 0,3% (p/v) de albúmina bovina (Sigma), 0,1% (p/v) de NaN_3 y 0,1% (v/v) de Tween 20. 100µl de cada una de las diluciones, se añade por duplicado a sendos discos.

Los tubos se mantienen 4 horas a TA, cubiertos para evitar la evaporación, transcurrido este tiempo, se someten a tres lavados de 10 minutos de duración con 0,9% (p/v) de NaCl y 0,1% (v/v) de Tween 20. Tras aspirar el sobrenadante correspondiente al último lavado, se añaden 100µl de anti-AFP marcada con ^{125}I , diluída con solución salina tamponada con fosfato 0,005M pH7,4, de tal forma que sean introducidas en cada tubo 200.000 cpm, aproximadamente. Se tapan los tubos y se dejan a TA durante

12 horas. Al día siguiente, se someten a cuatro lavados con NaCl al 0,9% (p/v) y 0,1% (v/v) de Tween 20. Tras aspirar el último sobrenadante, teniendo la precaución de que los tubos queden absolutamente secos, se llevan a un contador gamma y se cuentan durante 1 minuto. Los resultados obtenidos, se expresan como la media de las cpm de cada muestra.

Se procede al trazado de la curva estandar, tomando en abcisas las concentraciones y en ordenadas la media de las cpm de las muestras.

Los valores de las muestras estudiadas, se calculan por interpolación en la curva estandar (FIGURA XIII pag.108).

3.3.6 RADIOINMUNOANÁLISIS COMERCIAL DE ALFA-FETOPROTEINA

Para la determinación de AFP en suero y líquido amniótico, ha sido comercializado un radioinmunoanálisis basado en la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo con Polietilen-glicol (PEG).

La sensibilidad del método es alrededor de 3ng/ml. El análisis se realiza por duplicado poniendo en cada tubo 100µl de las muestras a estudiar, 100µl de suero anti-AFP y 100µl de AFP marcada con ^{125}I . Simultáneamente, se preparan dos tubos marcados con la letra (C), que contienen 100µl de la AFP radioactiva, dos controles (NSB) en los que se añaden 200µl de tampón fosfato 0,01M pH7,5 y 100µl de AFP marcada con ^{125}I , y por último, dos tubos marcados con la letra (B) blancos, con 100µl de tampón fosfato 0,01M pH7,5, 100µl de anti-AFP y 100µl de AFP radioactiva.

La curva estandar, se prepara a partir de una AFP de concentración conocida, haciendo diluciones seriadas por duplicado.

Las mezclas se agitan cuidadosamente y se incuban de 18 a 24 horas a TA.

Posteriormente, se añade a cada tubo, (excepto a los dos (C)) 100µl de gamma-globulina de suero bovina y 100µl de solución de PEG 20%

(p/v) en tampón fosfato 0,01M pH7,5. Se mezcla por agitación y se centrifuga a 1.500xg durante 15 minutos. Se decanta el sobrenadante por inversión y cada tubo se lava con 2ml de agua destilada. A continuación se centrifuga de nuevo a la misma velocidad y tras decantar el sobrenadante, el precipitado es introducido en un contador gamma (LKB) para proceder al conteo durante un minuto.

El porcentaje máximo de unión se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ max.de unión} = \frac{\text{media de cpm de B} - \text{media de cpm de NSB}}{\text{media de las cpm de C}} \times 100$$

El título del antisuero anti-AFP, viene ajustado para que se obtenga un porcentaje de unión máximo de 40-80%.

El porcentaje de unión relativo de las muestras problema y de la curva estandar se calcula:

$$\% \text{ de unión relativo} = \frac{\text{media de cpm de la muestra} - \text{media de cpm de NSB}}{\text{media de cpm de B} - \text{media de cpm de NSB}} \times 100$$

A continuación se trazan los perfiles de la curva estandar en papel semilogarítmico, tomando en abcisas las concentraciones y en ordenadas el porcentaje de unión de cada una de las diluciones de AFP estandar.

Las concentraciones desconocidas, se hallan por interpolación en la curva estandar del porcentaje correspondiente a cada muestra problema.

3.4 FRACCIONAMIENTO DE SUERO DE MUJERES EMBARAZADAS

3.4.1 SUERO DE MUJERES GESTANTES

Muestras de sangre de mujeres grávidas, son extraídas por punción venosa. Se mantiene durante 1 hora a TA y una vez retraído el coágulo, se centrifuga a 1.500xg, recogiendo el sobrenadante. Se determina la concentración de proteínas totales por el método Folin (140) y la de AFP por Radioinmunoensayo. Cada suero es protocolizado, teniendo en cuenta el tiempo de gestación al cual fué extraído y su contenido en AFP.

3.4.2 SUERO DE GESTANTES DESPROVISTO DE AFP

Se aplica 1ml de suero de mujer grávida, sobre una columna (1x20 cm) de Sepharosa 4B activada con CNBr, a la que se ha acoplado 30mg/ml de Sepharosa, de la fracción globulinica de un suero de conejo anti-AFP (Operón), según el apartado 3.2.8.1. Fracciones de 0,5ml, son eluidas con tampón fosfato 0,15M pH7,2 a una velocidad de flujo de 10ml/hora. El contenido protéico de cada fracción, se detecta mediante absorción de luz ultravioleta a 280nm. Las fracciones protéicas, se mezclan y concentran por presión negativa hasta 1ml. A continuación, se reserva una alícuota del concentrado y se comprueba, por RIA, la eliminación total de AFP.

Posteriormente, se regenera la columna, con una solución de Glicina/HCl 0,5M pH3, conteniendo NaCl 0,15M y después se equilibra con tampón fosfato 0,15M pH7,2 para posterior uso.

3.4.3 FILTRACION A TRAVES DE SEPHADEX G-200 SUPERFINO

Se llevó a cabo en columnas de Pharmacia K26/45 rellenas con gel de Sephadex G-200 superfino.

Seis gramos de Sephadex G-200 superfino (Pharmacia Fine Chem.), se dejan hinchar en agua destilada durante dos días. Cuando la suspensión está preparada, se rellena la columna y se equilibra haciendo pasar a su

través NaCl 0,5M tamponado a pH7,2 con $K_2H_2PO_4/Na_2HPO_4$ 0,01M.

Muestras de 1ml de suero humano normal o suero de mujeres embarazadas desprovisto de AFP, se mezcla con 0,1g/ml de sacarosa con el fin de aumentar su densidad y facilitar su aplicación. La muestra se deposita sobre la superficie del gel y se comienza la elución con la solución de equilibrado. se recogen fracciones de 1ml a un flujo de 8ml/hora y se mide su contenido protéico por absorción de luz ultravioleta a 280nm. Con los resultados de las lecturas se traza el perfil cromatográfico, tomando en abscisas el número de fracciones recogidas y en ordenadas las densidades ópticas. El cromatograma, muestra tres picos, correspondientes a las fracciones 19S, 17S y 4S, determinadas por ultracentrifugación analítica. Cada una de las cuales, se concentra por ultrafiltración, presión negativa, hasta 1ml, midiendo su contenido protéico por el método Folin.

La columna se recicla, haciendo pasar solución de equilibrado con el fin de eliminar los componentes de pequeño Pm, así como la sacarosa y se deja preparada para ulteriores filtraciones.

3.4.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Las fracciones obtenidas por Sephadex G-200, se analizan por gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS) en placa 7x18 cm., según el método descrito por Laemli (141).

3.4.4.1 TAMPONES Y SOLUCIONES

a) Solución de acrilamida (Bio-Rad) 30% (p/v), bisacrilamida (Bio-Rad) 8% (p/v) en agua destilada. Se filtra en papel Whatmann 1 y se almacena a 4°C.

b) Tampón del gel de separación: 1,5M Tris, 0,4% (p/v) SDS en agua destilada, pH8,8.

c) Tampón del gel de concentración: 0,5M Tris, 0,4% (p/v) SDS

en agua destilada, pH6,8.

d) Tampón de electroforesis 3g/l Tris, 14,4 g/l glicina, 1g/l SDS en agua destilada.

e) tampón de muestras: se prepara mezclando 12,5ml de tampón c, 10ml de glicerol, 5ml de 2-mercaptoetanol y 1g de SDS, completando hasta 100ml con agua destilada.

3.4.4.2 PREPARACION DEL GEL

Se utiliza gel de poliacrilamida en gradiente de 10 a 5 %.

Los geles se preparan realizando las siguientes mezclas:

<u>10%</u>	<u>5%</u>
16,6 ml de agua destilada	23 ml de agua destilada
10 ml de tampón b	10 ml de tampón b
13,4 ml de solución a	6,7 ml de solución a

Para favorecer la gelificación, se añaden como catalizadores 0,16 ml de persulfato amónico 10% (p/v) y 20 µl de Temed (Bio-Rad).

A continuación se conecta un mezclador de gradiente a los recipientes de ambos geles, de tal forma que el primer gel que se deposita en la placa sea la mezcla realizada al 10%.

La ubicación del gel, se realiza entre dos vidrios separados por espaciadores de teflón y sellados con agar, excepto por la parte superior, dejándose en reposo hasta que haya gelificado.

Para evitar la formación de irregularidades en la superficie del gel, se deposita sobre ésta una capa de butanol, la cual se retira posteriormente y se lava con agua destilada y tampón c.

Seguidamente, se deposita una mezcla de la siguiente composición: 13 ml de agua destilada, 5 ml de tampón c, 4 ml de solución a, 0,12 ml de persulfato amónico 10%(p/v), 10 µl de Temed.

Esta mezcla, al gelificar, da lugar al gel de concentración.

Sobre la superficie del gel, se coloca cuidadosamente, un peine de teflón, con el fin de formar los pocillos, donde serán depositadas las muestras.

3.4.4.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y MARCADORES

Las muestras se resuspenden en 0,1 ml de tampón e, al que se añaden 20µl de azul de bromofenol al 0,2% (p/v) por mililitro. Se hierven durante 5 minutos, se centrifugan y los sobrenadantes se aplican en los pocillos practicados en la parte superior del gel de concentración.

Del mismo modo, se preparan los marcadores: Seroalbúmina bovina (68.000 D), cadena pesada de IgG (50.000 D), Ovoalbúmina (45.000 D) y cadena ligera de IgG (23.000 D).

3.4.4.4 DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS

La electroforesis se desarrolla a 40V, hasta que las muestras se concentran en la superficie del gel de separación. A continuación se incrementa el voltaje a 120V.

3.4.4.5 TINCION Y FIJACION

Cuando el frente llega a 0,5-1 cm del borde del gel, la electroforesis finaliza y se procede a la tinción durante una noche con una solución de la siguiente composición: 150 ml de metanol , 375 ml de agua destilada, 60 g de ácido tricloroacético , 18 g de ácido sulfosalicílico , 0,5 g de azul Cromasie.

Posteriormente, se destiñen con una solución que contiene: 520 ml de agua destilada , 473 ml de metanol , 57 ml de ácido acético.

Por último se seca el gel en un secador de geles (Belenguer).

Para la identificación de las bandas, se tiene como referencia de P_m, la posición de los marcadores.

3.5 CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES IN VITRO

Todo el material utilizado en el cultivo de células mononucleares, debe ser estéril, realizándose la preparación de las células en una campana de flujo laminar (Tiestar), utilizando material de plástico y vidrio estéril, además de filtros (Millipore) para filtrar soluciones no estériles preparadas en el laboratorio.

3.5.1 OBTENCION DE LIFOCITOS HUMANOS

En condiciones estériles, se extraen de 25 a 50 ml de sangre venosa, de los que 5 ml se coagulan para la obtención de suero y los 20 o 45 ml restantes se heparinizan con 20 UI de heparina (libre de conservantes) por mililitro.

La sangre se diluye al medio en solución salina. En una serie de tubos estériles (Sterilin), se introducen 3 ml de Lymphoprep (Nyegaard and Co-As Oslo, 1,077 g/ml), añadiéndose por deslizamiento a lo largo de la pared del tubo, 5 ml de la sangre diluida. A continuación se centrifuga a TA durante 20 minutos a 400xg (142).

Las células mononucleares, se recogen de la interfase y se lavan dos veces con solución equilibrada de Hank, centrifugándose 10 minutos a 400xg la primera vez y a 200xg, la segunda. Finalmente, se resuspenden en medio de cultivo RPMI 1640 (Flow) enriquecido y se procede a la identificación morfológica y recuento de los linfocitos en un hemocitómetro (Neubauer Preciss), mediante microscopía óptica (Nikon AFM). El número total de células obtenido, viene dado por el siguiente cociente:

$$\frac{\text{nº de células en 16 cuadros} \times \text{volumen de la suspensión celular}}{\text{capacidad de la cámara } (10^{-4})}$$

Seguidamente, se centrifuga la suspensión durante 10 minutos a 200xg y se llevan las células a una concentración de 10×10^6 células/ml de medio de cultivo enriquecido.

3.5.2 VIABILIDAD CELULAR

Se calcula por la prueba de exclusión de Azul Tripán. Tal como se ha descrito la técnica de aislamiento de linfocitos de sangre periférica, siempre fué superior al 98%.

La prueba se realiza mezclando a partes iguales un volumen de una solución de azul tripán previamente preparada con otro de la suspensión celular. Se incuba durante 1 minuto a TA y se cuenta el número de células teñidas (Células muertas) y no teñidas, antes de que transcurran 5 minutos desde el inicio de la tinción.

El número de células viables se calcula mediante la siguiente operación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{nº de células no teñidas}}{\text{nº de células totales}} \times 100$$

3.5.3 PREPARACION DE HEMATIES DE CARNERO

En condiciones estériles, se extraen 5 ml de una suspensión de sangre de carnero en solución de Alsever y se centrifuga durante 5 minutos a 1.400xg, con el fin de separar los hematíes del plasma. Las células se lavan tres veces con solución salina fisiológica pH7,2 y se llevan a una concentración del 2% (p/v) en el mismo medio. Posteriormente, se incuban durante 25 minutos a 37°C con 15 UI/ml de Neuraminidasa (Behring-Institut), con el fin de sensibilizar por desialización la membrana de los hematíes. Seguidamente, se centrifugan 5 minutos a 1.400xg y se lavan de nuevo tres veces con solución salina fisiológica, resuspendiéndose a una concentración final de un 2% en el mismo medio (143).

3.5.4 PREPARACION DE SUERO DE TERNERA FETAL ADSORBIDO

Para evitar las interacciones inespecíficas entre la membrana del eritrocito de carnero y el suero de ternera fetal (Flow), se mezcla

el suero y una suspensión de hematíes lavados y sin diluir a razón de 4/1. Se incuban 2 horas a 4°C con agitación esporádica y a continuación se centrifugan durante 5 minutos a 1.500xg para recoger el sobrenadante (suero de ternera fetal adsorbido).

3.5.5 FORMACION DE ROSETAS ESPONTANEAS

En tubos estériles (Sterilin) de 10 ml se mezclan:

- 1,50 ml de hematíes de carnero al 2%, lavados y tratados con Neuraminidasa.

- 0,75 ml de suero de ternera fetal adsorbido .

- 0,75 ml de células mononucleares a una concentración de 10×10^6 células/ml.

Se centrifugan 6 minutos a 100xg y se incuban durante 1 hora a TA. FIGURAS III y IV.

3.5.6 AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y POBLACIONES NO T

Las células formadoras de rosetas espontáneas (rosetas E) o células T, se separan de las no formadoras de rosetas E, por el procedimiento siguiente: Sobre 3 ml de Lymphoprep, se deposita cuidadosamente la suspensión de rosetas y se centrifuga durante 20 minutos a 400xg. De la interfase, se recoge una población rica en células B. Del botón de hematíes formado en el fondo, se obtienen los linfocitos T previo tratamiento con solución de lisis para eliminar los eritrocitos. Ambas poblaciones, se lavan por separado dos veces con solución de Hank, primero 10 minutos a 400xg y después a 200xg. A continuación, se resuspenden en medio de cultivo enriquecido y se comprueba la viabilidad por la prueba de exclusión de azul tripán. Según esta técnica, la viabilidad celular siempre es mayor del 95%.

La riqueza de estas poblaciones T y no T, se determina por rosetas espontáneas e inmunoglobulina de superficie respectivamente.

FIGURA III**ROSETAS ESPONTANEAS : Marcador de linfocitos T**

Objetivo 40 x 10

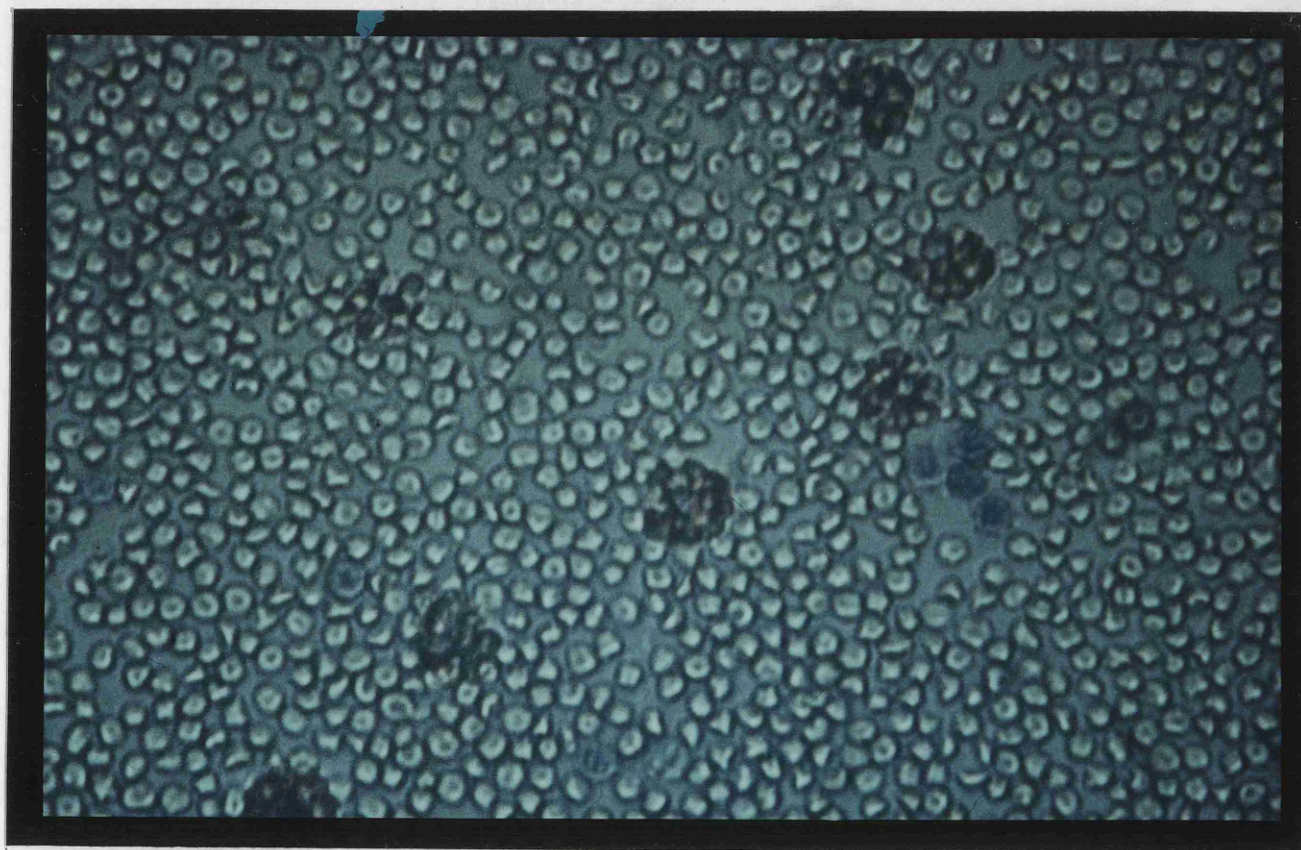
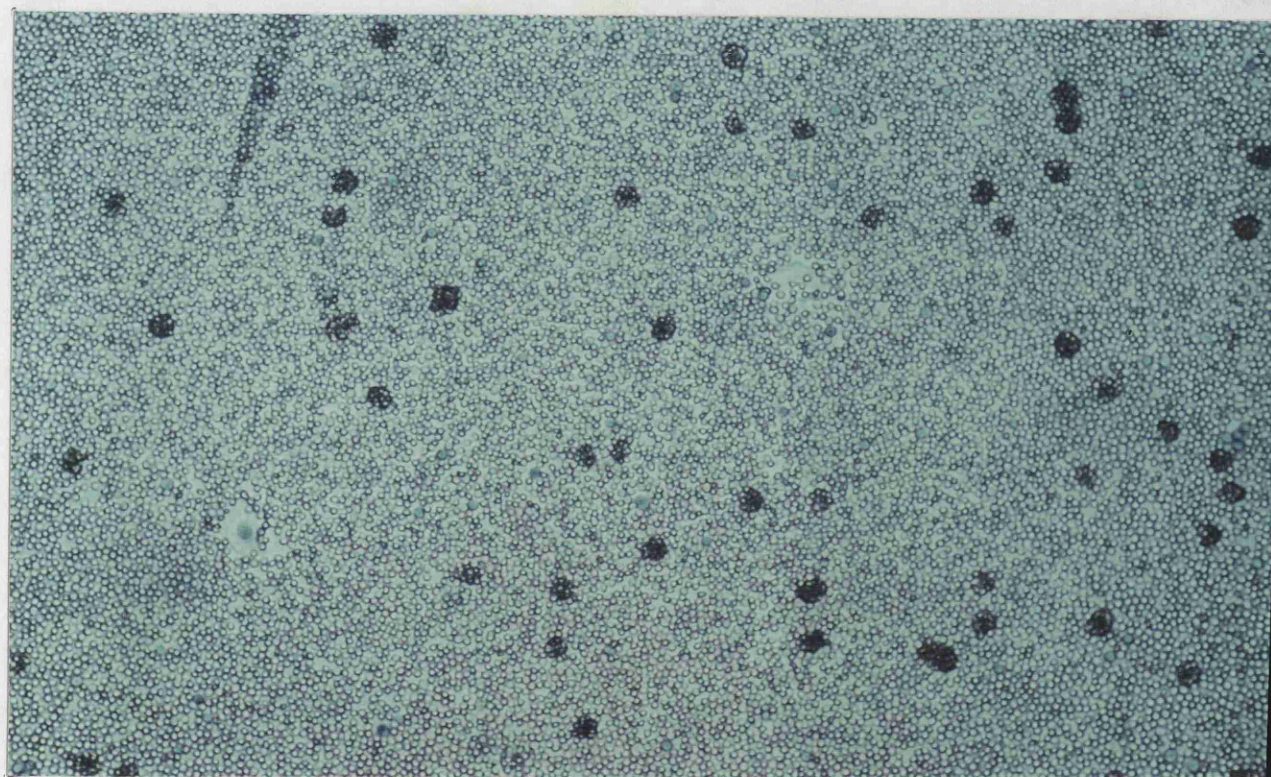


FIGURA IV**ROSETAS ESPONTANEAS : Marcador de linfocitos T**

Objetivo 25 x 10



3.5.7 INMUNOGLOBULINA DE SUPERFICIE

Las inmunoglobulinas de superficie son los marcadores específicos de las células B (144) FIGURA V.

0,1 ml de la suspensión de linfocitos a la concentración de 10×10^6 células/ml, se incuban durante 30 minutos a 4°C con antisuero anti-inmunoglobulinas humanas a una dilución final 1/10, marcado con fluoresceína (Behring Institut). Posteriormente se lava dos veces a $400 \times g$, 10 minutos, con solución de Hank conteniendo 0,5%(p/v) de azida sódica. Se elimina el último sobrenadante muy cuidadosamente y se añade una gota de glicerina 30% (v/v). Se deposita la muestra sobre un porta-objetos, para realizar el conteo celular en un microscopio de fluorescencia (Zeiss).

El porcentaje de células que portan inmunoglobulinas en su superficie, se expresa:

$$\text{Ig}^+ = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células fluorescentes}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

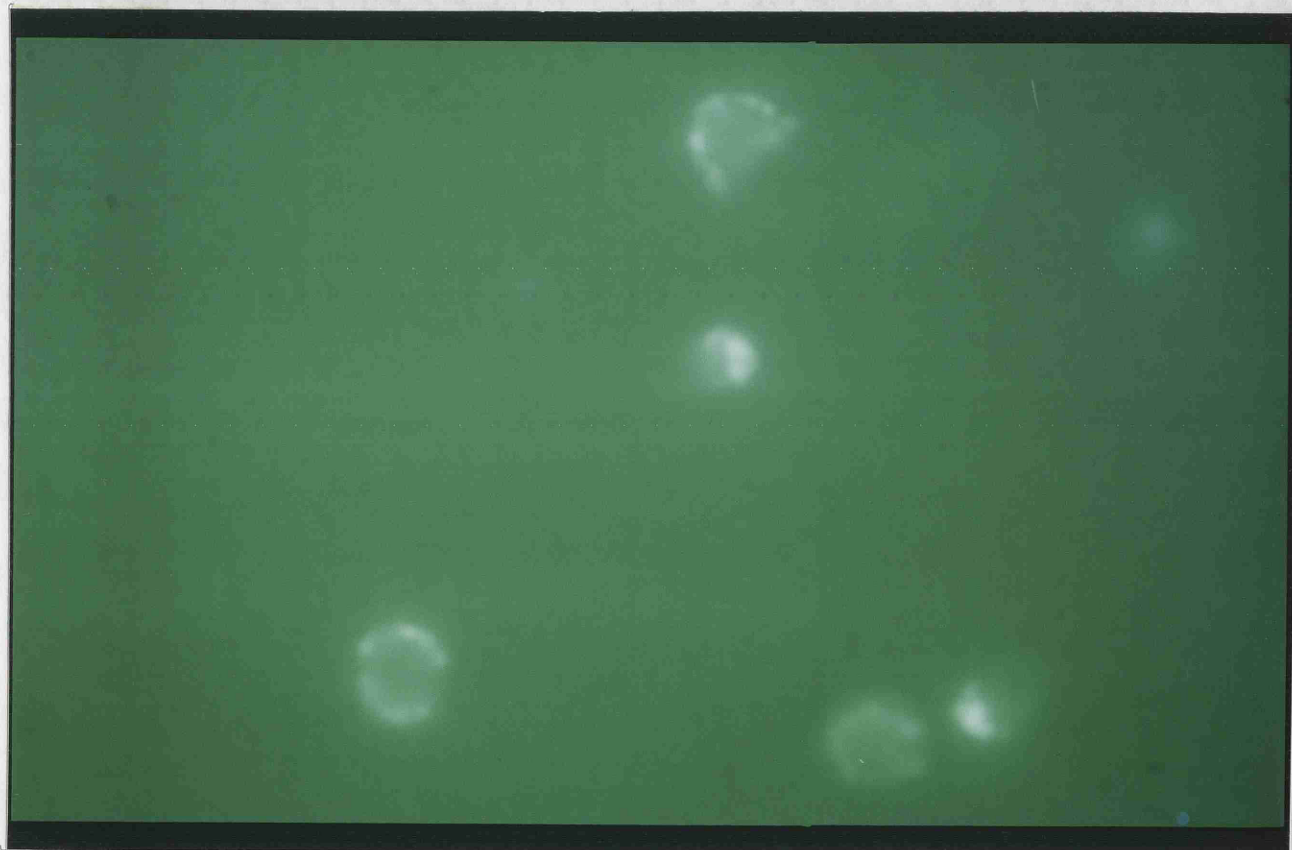
3.5.8 RENDIMIENTO DE LA TECNICA

Alícuotas de ambas suspensiones celulares, T y no T, se someten a las técnicas de formación de rosetas espontáneas e inmunoglobulina de superficie.

Sobre un porta teñido con azul de toluidina, se deposita una gota de suspensión de rosetas y se mezcla cuidadosamente con una pipeta Pasteur, hasta que adquiere color azulado. la preparación se lleva a una cámara Neubauer y se cuenta el número de rosetas con respecto al de linfocitos totales. Solo se consideran rosetas positivas, aquellos linfocitos rodeados al menos de tres hematíes.

El porcentaje de rosetas en el caso de la suspensión de células T, es mayor del 95% y en el caso de la suspensión enriquecida en células

FIGURA V INMUNOGLOBULINA DE SUPERFICIE; Marcador de linfocitos B



B, menor del 2%. El número de células portadoras de inmunoglobulinas de superficie, en esta última suspensión está comprendido entre el 60-80%, siendo menor del 2% en el caso de las células formadoras de rosetas.

3.5.9 PREPARACION Y DESARROLLO DE LOS CULTIVOS

Se preparan distintas concentraciones de las suspensiones de células mononucleares obtenidas de sangre periférica; T o TyB simultáneamente. Cada preparación se reparte en alícuotas de 1,2 ml, a cada una de las cuales se les añade en unos casos, suero autólogo o suero de mujeres embarazadas y en otros suero autólogo y distintas concentraciones de las muestras controles o problema a estudiar.

Los cultivos se hacen por triplicado, depositando volúmenes de 0,25 ml en los pocillos de microplacas de cultivo (Sterilin).

Los mitógenos utilizados para la estimulación blástica fueron: Fitohemaglutinina, PHA, (Gibco) a una dosis de 8 μ l/ml para los cultivos de células T y PHA o Pokeweed, PWM, (Gibco) a 10 μ l/ml, para los cultivos simultáneos de las mezclas de células T y suspensiones enriquecidas en células B. Todo ello frente a respectivos controles sin mitógeno. Los cultivos mixtos heterólogos se realizan en ausencia de lectina.

Una vez preparadas las placas, se incuban durante 96 horas en una cámara de cultivo (Forma Scientific) a 37°C con atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂.

Dieciocho horas antes de finalizar el cultivo, se añade 1,6 μ Ci/ml de timidina tritiada (Amersham).

3.5.9.1 CULTIVOS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN PRESENCIA DE SUERO DE GESTANTES

Se preparan distintas concentraciones de ambas suspensiones de células mononucleares obtenidas de sangre periférica.

Cada preparación de linfocitos, se reparte en alícuotas de 1,2 ml, a cada una de las cuales se les añade 0,30 ml de suero, bien suero autólogo que se tomará como control o sueros de mujeres embarazadas. Ambas preparaciones, se cultivan separadamente.

Por otro lado, se preparan mezclas del mismo volumen, de linfocitos T y B a distintas razones, suplementadas con 20% de suero en las mismas condiciones anteriores.

3.5.9.2 CULTIVO DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE AFP PURIFICADA

El suero de mujeres embarazadas, es reemplazado por AFP purificada en un amplio intervalo de concentración, desde 0,025 hasta 8.520 ng/ml de cultivo en volúmenes variables, según la concentración de la muestra. Los cultivos controles, se realizan añadiendo a la suspensión celular, volúmenes de solución salina fisiológica, idénticos a los añadidos de AFP, en los cultivos problema.

Los cultivos son suplementados con 2,5% (v/v) de suero autólogo y la concentración celular es 6×10^5 células/ml.

3.5.9.3 CULTIVO DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE SUEROS DE MUJERES GESTANTES DESPROVISTOS DE AFP (SE-AFP)

La preparación y desarrollo del cultivo, se realiza de la forma anteriormente descrita (3.5.9). En este caso, la muestra problema es un suero de mujer grávida desprovisto de AFP, mediante inmunoabsorbente, como se detalla en apartados anteriores.

La dosis empleada es 20% (v/v) y la concentración celular, 6×10^5 células/ml. Los resultados obtenidos son sometidos a estudio comparativo con tres tipos de controles realizados en presencia de:

- 20% (v/v) de suero autólogo.
- 20% (v/v) de una mezcla de suero humano normal (SHN), pasado

por el mismo inmunoabsorbente.

- 20% (v/v) del suero de mujer embarazada utilizado, completo.

3.5.9.4 CULTIVO DE LINFOCITOS T EN PRESENCIA DE LAS FRACCIONES 19S, 7S Y 4S DE SUERO DE MUJERES GESTANTES DESPROVISTO DE AFP

Primeramente, se hicieron una serie de experimentos, añadiendo a una concentración fija de células T (6×10^5 células/ml), una amplia variedad de concentraciones de las distintas fracciones obtenidas por filtración a través de Sephadex G-200, manteniendo constante el volumen final del cultivo. Las dosis empleadas, fueron desde 3 mg/ml hasta 15 μ g/ml de cultivo. Posteriormente, dados los resultados, se utilizaron dosis experimentales de 240, 120, 60 y 30 μ g/ml de cultivo. Cada uno de los ensayos, se calibra con dos controles, realizados en presencia de:

- Albúmina humana (Sigma) en concentraciones idénticas a las distintas fracciones probadas.
- Solución salina pH7,2 , que es el diluyente utilizado en cada una de las fracciones.

Simultáneamente, se realizan ensayos en paralelo con las fracciones 4S, 7S y 19S obtenidas por filtración de sueros humanos normales, a través de Sephadex G-200.

Todos los cultivos son suplementados con 0,5% (v/v) de suero autólogo.

3.5.9.5 CULTIVO MIXTO HETEROLOGO INCUBADO CON FRACCION 4S DE SUERO DE GESTANTE DESPROVISTO DE AFP

Se procede a aislar los linfocitos T y B, pertenecientes a dos sujetos, según la técnica de rosetas espontáneas. Las poblaciones linfocitarias, se ajustan a 1×10^5 células/ml. Posteriormente se mezclan volúmenes iguales de las cuatro preparaciones de linfocitos, de forma que las células

T de un sujeto, se cultivan con las células B de otro donante. La incubación se realiza en presencia de distintas concentraciones de la fracción 4S de suero de mujeres embarazadas sin AFP.

Los cultivos son suplementados con 0,5% (v/v) de un pool de suero humano normal.

3.5.9.6 CULTIVO DE CELULAS T EN PRESENCIA DE AFP PURIFICADA Y FRACCION 4S DE SUERO DE GESTANTES DESPROVISTO DE AFP

Los cultivos se realizan añadiendo simultáneamente AFP purificada y fracción 4S de suero de mujer grávida sin AFP, sobre la suspensión de células T a 6×10^5 células/ml de cultivo, manteniendo constante el volumen final de cada ensayo. Se emplean concentraciones fisiológicas de AFP, alcanzas normalmente durante el embarazo: 40, 20, ó 10 ng/ml de cultivo y 30 µg/ml de cultivo, de la fracción 4S de sueros de mujeres embarazadas sin AFP.

Las condiciones controles, para valorar los resultados son:

- 30 µg/ml de albúmina humana (AH).
- 30 µg/ml de la fracción 4S de suero humano normal (SHN).
- 30 µg/ml de la fracción 4S de SHN + 40, 20 ó 10ng/ml de AH.
- 30µg/ml de la fracción 4S de SHN + 40, 20 ó 10ng/ml de AFP.
- 30 µg/ml de la fracción 4S de suero de gestante sin AFP +
40, 20 ó 10 ng/ml de AH.

Todos los cultivos, son suplementados con 0,5% (v/v) de suero autólogo.

3.5.10 RECOGIDA DE LOS CULTIVOS

Se realiza dieciocho horas después de la pulsación de timidina tritiada (^3H Timidina).

Para ello se utiliza papel de filtro (Titertek Flow), colocado

en un recolector de células (Titertek), conectado a una bomba de vacío. El aparato recoge y lava con solución salina pH7,2 la suspensión celular incubada en cada uno de los pocillos de la microplaca de cultivo. Se retiran los filtros y se introducen en viales de contaje (Comercial Anger) dejándolos secar durante 1 hora a TA, transcurrido este tiempo, se incuban durante 25 minutos con 0,5 ml de NCS (Amersham Searle), posteriormente se añaden 2,5 ml de líquido de centelleo. Se agitan y se mide la radioactividad incorporada en un contador beta (Mark IV) durante 1 minuto.

Los resultados de los cultivos de linfocitos T y de los cocultivos T:B, se expresan como la media de las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en los triplicados y el índice de estimulación, se calcula dividiendo cada una de las medias de los triplicados estimulados con mitógeno, por las medias de los triplicados de sus respectivos controles (sin mitógeno).

Los datos resultantes de los cultivos mixtos heterólogos, se expresan simplemente por la media de las cpm obtenidas y la desviación estandar.

3.6 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se obtienen linfocitos de sangre periférica y se procede al roseteo para obtener las células T, las cuales se llevan a la concentración de 10×10^6 células/100µl de medio de cultivo con 10% de suero de ternera fetal. Se incuban con agitación esporádica durante 1 hora a 37°C con 100µl de ^{51}Cr (1µCi/ml) (Amersham) por cada 100µl de la suspensión celular (145). Finalizada la incubación, se lavan tres veces con medio de cultivo enriquecido midiendo la radioactividad de cada sobrenadante. A continuación, se cuentan los linfocitos y se incuban a una concentración de 6×10^5 células/ml con PHA, en pocillos de microplacas de cultivo, en presencia de las muestras problema y control respectivamente a las condiciones ya descritas (la PHA es añadida solo con el fin de que la célula esté en las mismas condiciones que las del cultivo).

De cada preparación, se destinan dos pocillos para medir la liberación máxima y otros dos para medir las liberaciones experimental o espontánea respectivamente. La liberación espontánea, es la producida por los linfocitos incubados en presencia de la muestra control. La liberación experimental, es la resultante de la incubación con la muestra problema. Por último, la liberación máxima, indica la radioactividad incorporada en cada caso.

Se añaden 50 µl de HCl 0,1 M en los pocillos destinados para medir la liberación máxima y 50 µl de solución salina fisiológica en los que se va a cuantificar las liberaciones experimental y espontánea.

Se realizó una cinética de incubación durante 24, 48, 72 y 96 horas, transcurrido el tiempo, se centrifuga la microplaca de cultivo a 800xg durante 5 minutos, se toman 100 µl de cada sobrenadante y se mide la radioactividad en un contador gamma (LKB).

La citotóxicidad se valora según la siguiente formula:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

3.7 ESTUDIO CINETICO DE SUBPOBLACIONES DE CELULAS T MEDIANTE ANTICUERPOS

MONOCLONALES

La cuantificación se realiza según el método de Reinherz (16).

Se aíslan linfocitos de sangre periférica por el procedimiento descrito anteriormente, se cultivan en placas Petri (Sterilin 30x30 mm) a una concentración de 3×10^6 células/ml en presencia de las muestras control y problema. Se realizan incubaciones durante 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, en estufa a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad. Transcurrido cada periodo, se recoge el contenido de las placas y se lava dos veces con medio de cultivo enriquecido. Posteriormente se cuentan los linfocitos en cada preparación y se llevan a una concentración de 10×10^6 células/ml de medio de cultivo enriquecido.

Alícuotas de 100 µl, se incuban durante 30 minutos, a 4°C con 5 µl de antisueros que contienen anticuerpos monoclonales comerciales (Ortho Jonhson), obtenidos de ratón: anti-marcadores específicos de linfocitos T humanos; T totales (OKT 3), T cooperadores (OKT 4) y linfocitos citotóxicos/supresores (OKT 8) respectivamente.

A continuación, se lavan dos veces (200xg, 7 minutos), con 2 ml de solución salina fría pH7,2. Se extrae todo el sobrenadante y se incuba de nuevo durante 30 minutos a 4°C con 100 µl de antisuero fluoresceína-do (Cappel) que contiene anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra. Finalmente, se elimina el exceso de fluoresceína mediante dos lavados con solución salina pH7,2. Se extrae todo el sobrenadante y se preparan las células para contar en un microscopio de fluorescencia (Zeiss), con una gota de glicerina al 30% (v/v) en solución salina pH7,2.

La especificidad de la tinción, se determina incubando el antisue-ro fluoresceinado con células no tratadas con los anticuerpos monoclonales. El grado de inespecificidad fué menor del 2%

4-RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL SUERO DE GESTANTES EN CULTIVOS DE LINFOCITOS

4.1.1 RESPUESTA DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA EN PRESENCIA DE SUEROS DE MUJERES EMBARAZADAS

Con el fin de determinar una concentración celular de trabajo, se probaron distintos niveles celulares: 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 células/ml. Los cultivos se estimularon con PHA y se incubaron en presencia de sueros de mujeres embarazadas o suero autólogo utilizado como control. Los datos se representan en una gráfica (FIGURA VI), anotando en abcisas la concentración celular y en ordenadas, la incorporación de timidina tritiada (cpm $\pm \sigma$). Observándose que el nivel celular idóneo a partir del cual se obtiene una respuesta adecuada es 10^5 células/ml de cultivo, eligiéndose para toda la experimentación ulterior, el intervalo comprendido entre 10^5 y 10^6 células/ml.

En la TABLA 7, se muestra un experimento típico realizado con linfocitos T a distintas concentraciones celulares en un volumen final de 1,5 ml de medio de cultivo enriquecido en presencia de 0,30 ml (20%(v/v)) de suero de gestante o suero autólogo respectivamente. La incorporación de timidina tritiada, desciende a medida que disminuye el nivel celular y los índices de estimulación no son proporcionales a la concentración linfocitaria presente en el cultivo. La razón de los índices de estimulación obtenidos tras la incubación con suero de gestantes (SE) y suero autólogo (SA), es menor que la unidad en todos los casos, lo que indica que el suero de embarazada, inhibe la respuesta de linfocitos T estimulados con PHA.

La TABLA 8, resume 110 experimentos, realizados con linfocitos T a distintas concentraciones celulares, en presencia de distintos sueros de mujeres gestantes. Los datos detallan las medias de los índices de estimulación obtenidos en cada caso, los cuales están claramente disminuídos

con respecto a los controles (suero autólogo) y son independientes del nivel celular.

Los linfocitos de un mismo donante, se comportan de manera análoga, en presencia de distintos sueros de mujeres embarazadas .TABLA 9 .

Sin embargo, la respuesta linfocitaria a un mismo suero de mujer gestante, es muy variable de unos sujetos a otros. La TABLA 10, recoge los datos obtenidos de los cultivos de células T, procedentes de cuatro donantes en presencia de un suero de embarazada.

Con el fin de descartar alguna propiedad inherente del linfocito de mujeres embarazadas, que permitiera un comportamiento "in vitro" distinto del linfocito de sujetos normales, se realizaron once cultivos de células T de mujeres gestantes incubados con suero humano normal (SHN), procedente de una mezcla de sueros de sujetos sanos, y suero de gestante respectivamente, sometidos a las mismas condiciones que los linfocitos T de sujetos normales. Observándose que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los índices de estimulación de ambos linfocitos TABLA 11.

4.1.2 EFFECTO DE LA PRESENCIA DE CELULAS B EN CULTIVOS DE CELULAS T, ESTIMULADOS CON PHA O PWM E INCUBADOS CON SUEROS DE MUJERES GESTANTES

Se realizaron cocultivos T:B, manteniendo constante la concentración de células T (2×10^5 células/ml) y aumentando progresivamente el nivel de células B ($0-2 \times 10^5$ células/ml). Los cultivos se estimularon con PHA o PWM.

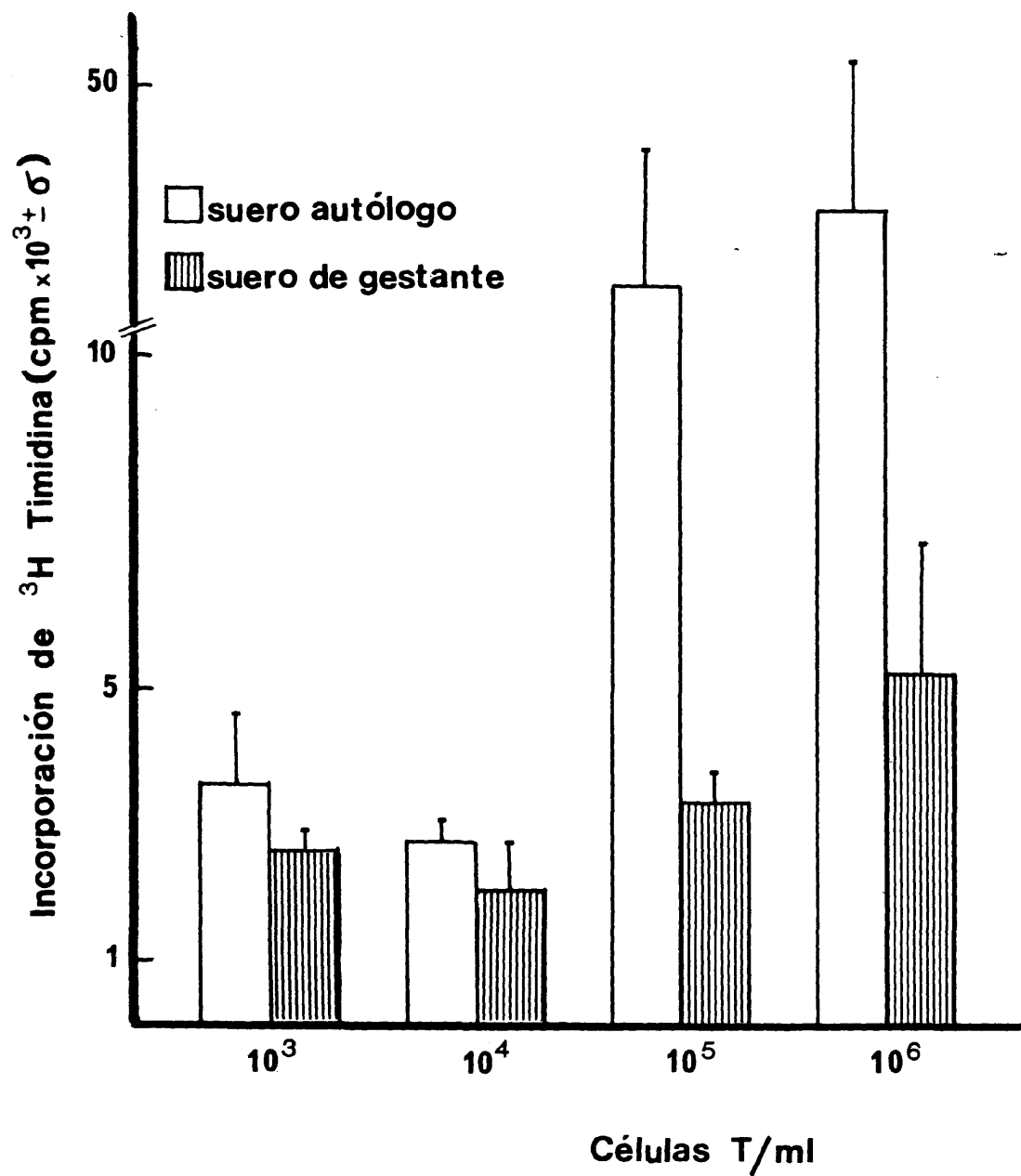
En la TABLA 12, se objetiva, que no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa, en los cultivos de células T y B estimulados con PHA. Es decir las células B, no tienen efecto demostrable en la inhibición observada, cuando las células T se cultivan aisladamente.

Por otro lado, cuando los cultivos se estimulan con PWM, TABLA 13, también se obtiene inhibición con respecto a los controles, en todos los casos y las diferencias de los índices de estimulación, a medida que aumenta la concentración de células B en el cultivo, no son significativas.

En la FIGURA VII, se ha representado, mediante un diagrama de barras, uno de los ensayos realizados. En ordenadas, se señala la incorporación de timidina tritiada ($\text{cpm} \pm \sigma$) y en abcisas la razón T/B en células/ml. El cultivo se estimuló con PHA y la concentración celular final, se mantuvo a 2×10^5 células/ml. La presencia de distintas concentraciones de células B en cultivos de células T, no altera la acción inhibidora del suero de mujeres gestantes, sobre estos últimos.

FIGURA VI

Efecto del suero de gestante sobre distintas concentraciones de células T estimuladas con PHA



CONCENTRACION DE	SUERO	INCORPORACION DE ^3H TIMIDINA $\bar{x} \pm \sigma$	INDICE DE ESTIMULACION	$\frac{1\text{SE}}{1\text{SA}}$
CELULAS T (cél/ml)		CONTROL	PHA	(i)

9×10^5	SA	114 ± 39	50.980 ± 8.131	446,56
9×10^5	SE	125 ± 34	5.218 ± 1.340	41,74
7×10^5	SA	153 ± 43	49.524 ± 5.127	323,68
7×10^5	SE	61 ± 27	2.617 ± 221	42,90
5×10^5	SA	218 ± 9	47.360 ± 3.432	217,24
5×10^5	SE	161 ± 9	6.557 ± 249	40,72
3×10^5	SA	180 ± 86	44.414 ± 8.476	246,74
3×10^5	SE	119 ± 67	2.675 ± 748	22,47

Cultivo realizado con un volumen final de 1,5 ml de la suspensión celular a $(9,7,5 \text{ y } 3) \times 10^5$ células/ml, incubado con 20% de suero autólogo (SA) o suero de gestante (SE).

T A B L A 8

EFECTO DEL SUERO DE GESTANTE SOBRE LINFOCITOS T ESTIMULA-

DOS CON PHA

CONCENTRACION DE CELULAS T(cél/ml)	SUERO	Nº DE EXPE- RIMENTOS	INDICE DE ESTI- MULACION (i) $\bar{x} \pm \sigma$	P	iSE/iSA
1x10 ⁵	SA	9	18,20± 6,60		
1x10 ⁵	SE	9	12,50± 5,47	<0,05	0,68
2x10 ⁵	SA	15	192,21±154,53		
2x10 ⁵	SE	15	44,53± 34,65	<0,05	0,23
3x10 ⁵	SA	12	194,93±145,90		
3x10 ⁵	SE	12	94,31±107,00	<0,05	0,48
4x10 ⁵	SA	10	299,53±214,87		
4x10 ⁵	SE	10	11,83± 85,97	<0,05	0,03
5x10 ⁵	SA	7	508,53±558,55		
5x10 ⁵	SE	7	64,10± 62,17	<0,01	0,12
6x10 ⁵	SA	26	350,57±255,35		
6x10 ⁵	SE	26	157,55±131,84	<0,05	0,44
7x10 ⁵	SA	6	286,47±113,01		
7x10 ⁵	SE	6	85,21± 31,27	<0,02	0,29
8x10 ⁵	SA	6	380,66±200,82		
8x10 ⁵	SE	6	76,18± 23,30	<0,01	0,20
9x10 ⁵	SA	5	302,51±102,51		
9x10 ⁵	SE	5	160,92±168,75	<0,05	0,53
10x10 ⁵	SA	9	416,84±296,41		
10x10 ⁵	SE	9	248,14±80,72	<0,01	0,59
13x10 ⁵	SA	5	449,43±172,00		
13x10 ⁵	SE	5	153,78± 93,97	<0,05	0,34

Total=110

T A B L A 9 RESPUESTA DE LINFOCITOS T (2×10^5 cél/ml), DE UN DONANTE A DISTINTOS SUEROS DE

MUJERES EMBARAZADAS

SUERO	INCORPORACION DE ^3H TIMIDINA $\bar{x} \pm \sigma$	INDICE DE ESTIMULACION	$\frac{iSE}{iSA}$
	CONTROL	PHA	(i)

SA	87 \pm 10	40.758 \pm 3.445	468,48
SE ₆	96 \pm 21	21.857 \pm 3.372	227,67
SE ₈	96 \pm 19	18.857 \pm 7.372	196,42
SE ₄	82 \pm 14	21.343 \pm 2.987	260,28

EN PRESENCIA DE UN MISMO SUERO DE GESTANTE

FUENTE DE LINFOCITOS		SUERO	INCORPORACION DE 3H TIMIDINA $\bar{x} \pm \sigma$	INDICE DE ESTIMULACION	ISE/ISA
		CONTROL	PHA	(i)	
1	SA1	121 ± 71	10.498 ± 1.261	86,76	
	SE	167 ± 58	2.445 ± 1.829	14,64	0,16
2	SA2	197 ± 23	25.347 ± 2.381	128,66	
	SE	78 ± 8	6.344 ± 185	81,33	0,63
3	SA3	522 ± 159	73.707 ± 6.283	141,20	
	SE	489 ± 123	58.402 ± 4.734	120,16	0,85
4	SA4	357 ± 21	29.141 ± 1.712	81,62	
	SE	486 ± 31	5.046 ± 1.362	10,17	0,12

T A B L A 11 RESPUESTA DE LINFOCITOS T DE MUJERES EMBARAZADAS

<u>LINFOCITOS</u>	<u>SUERO</u>	<u>Nº DE EXPERIMENTOS</u>	<u>INDICE DE ESTIMULACION(1) $\bar{x} \pm \sigma$</u>	<u>P</u>

T-NORMALES	SHN	11	473,20 \pm 112,73	
T-EMBARAZADAS	SHN	11	482,47 \pm 219,22	N.S.

T-NORMALES	SE	11	133,51 \pm 93,35	
T-EMBARAZADAS	SE	11	111,93 \pm 77,58	N.S.

T A B L A 12 **COCULTIVOS T:B ESTIMULADOS CON PHA**

T/B	SUERO	Nº DE EXPERIMENTOS	INDICE DE ESTIMULACION (i) $\bar{x} \pm \sigma$	P	ISE/iSA

2/0	SA	15	192,21 \pm 154,53		
2/0	SE	15	44,43 \pm 34,65		0,23
				N.S.	
2/0,5	SA	7	128,22 \pm 93,20		
2/0,5	SE	7	69,53 \pm 45,47		0,54
				N.S.	
2/1	SA	7	131,64 \pm 37,98		
2/1	SE	7	66,38 \pm 28,46		0,50
				N.S.	
2/1,5	SA	5	123,24 \pm 80,00		
2/1,5	SE	5	59,01 \pm 33,61		0,47
				N.S.	
2/2	SA	5	189,92 \pm 83,49		
2/2	SE	5	94,45 \pm 33,63		0,49

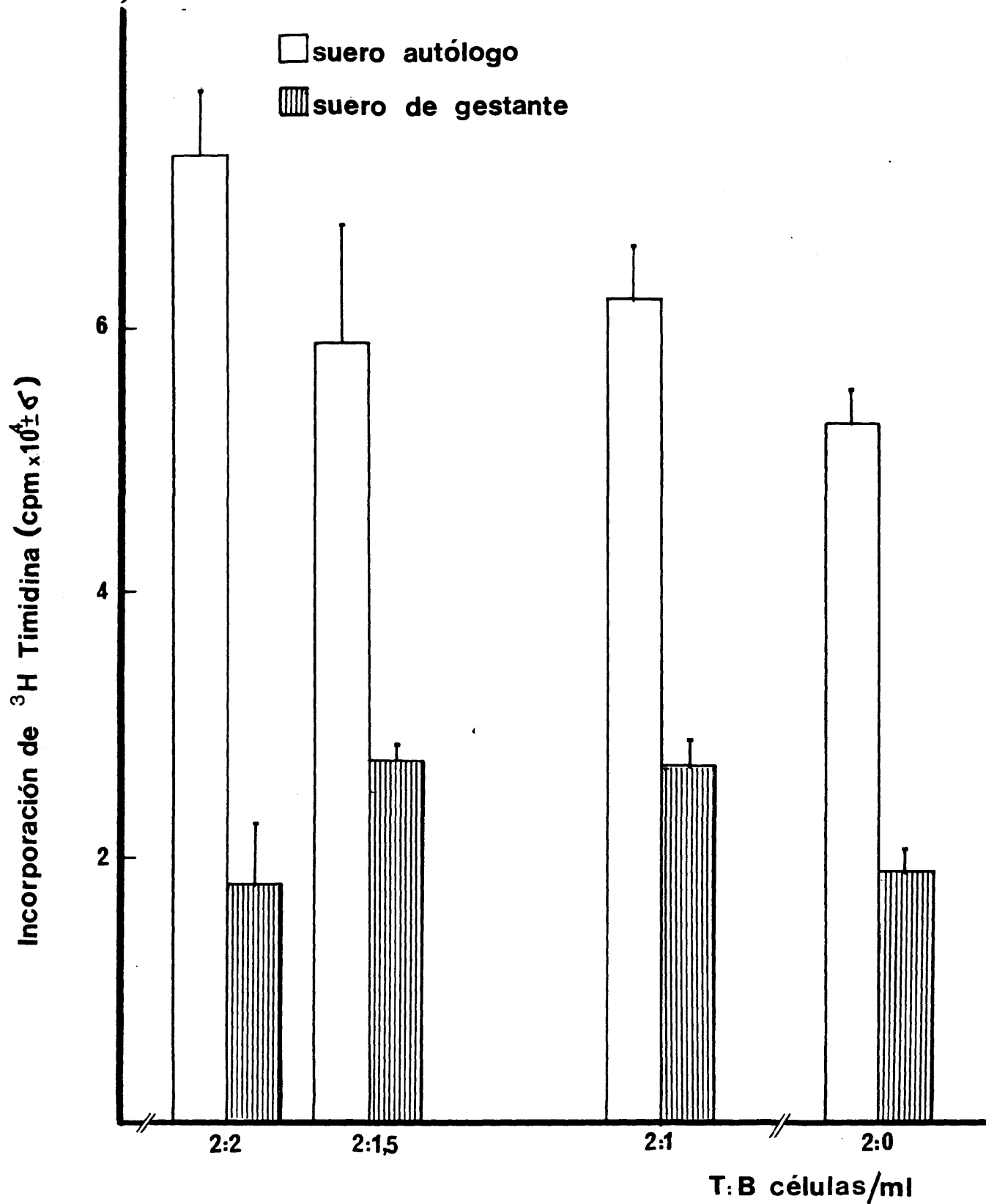
T A B L A 13 **COCULTIVOS T:B ESTIMULADOS CON PWM**

T/B	SUERO	Nº DE EXPERIMENTOS	INDICE DE ESTIMULACION (i) $\bar{x} \pm \sigma$	P	iSE/iSA

2/0,5	SA	7	72,51 \pm 30,37		
2/0,5	SE	7	41,60 \pm 29,40		0,57
				N.S.	
2/1	SA	7	58,23 \pm 11,77		
2/1	SE	7	32,68 \pm 12,74		0,56
				N.S.	
2/1,5	SA	5	69,51 \pm 48,11		
2/1,5	SE	5	48,03 \pm 36,36		0,69
				N.S.	
2/2	SA	5	82,34 \pm 32,66		
2/2	SE	5	50,39 \pm 15,20		0,61

FIGURA VII

*Efecto del suero de gestante sobre cultivos mixtos
autólogos estimulados con PHA*



4.2 ALFA-FETOPROTEÍNA

Con el fin de determinar si la AFP por sí misma, ejerce un efecto inmunosupresor durante el embarazo o si necesita de otras proteínas contenidas en el suero para desarrollar un mecanismo supresivo, se procedió a su obtención y posteriormente al estudio de su función biológica sobre linfocitos T.

4.2.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE AFP

La FIGURA VIII, es la representación gráfica de una cromatografía de afinidad en Sepharosa Con A, utilizando como eluyente tampón acetato 0,1 M pH6. En el primer pico, eluyen la albúmina y otras proteínas del suero fetal con bajo contenido en carbohidratos. El segundo pico corresponde a las proteínas que eluyen con solución de alfa-metil glucósido en tampón acetato 0,1 M pH6, entre las cuales se localiza la AFP, detectada por inmunodifusión doble bidimensional frente a suero anti-AFP humana de conejo FIGURA IX.

El grado de pureza de las muestras obtenidas, se analizó mediante inmunodifusión doble bidimensional frente a suero anti-humano de conejo FIGURA X y por inmunoelectroforesis, en donde se observa otra banda de precipitación, correspondiente a una alfa-globulina contaminante (revelada con suero anti-humano de conejo) FIGURA XI.

Las proteínas contaminantes se eliminaron mediante dos inmunoadsorbentes consecutivos: Sepharosa 4B activada con CNBr acoplada con suero de conejo anti-humano y con anti-alfa globulinas humanas, respectivamente. Posteriormente, se determinó su grado de pureza de nuevo, por inmunodifusión doble bidimensional frente a suero anti-humano de conejo FIGURA XII.

Una vez que las muestras fueron puras, por los criterios de pureza descritos anteriormente, se determinó su contenido en AFP por la

técnica de Radioinmunoensayo (RIA). En la TABLA 14, se representan los valores de una de las curvas estandar de un RIA realizado utilizando AFP comercial, de concentración conocida (320 ng/ml). Su representación gráfica, se muestra en la FIGURA XIII.

Algunas muestras, fueron cuantificadas por RIA competitivo utilizando un método comercial. Los valores de la curva estandar, se muestran en la TABLA 15 y su representación gráfica en la FIGURA XIV.

En la TABLA 16, se recogen las muestras de AFP purificadas y cuantificadas.

4.2.2 EFFECTO DE AFP PURIFICADA EN CULTIVOS DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA

Cuando se cultivan linfocitos T a 6×10^5 células/ml con 2,5% (v/v) de suero autólogo y concentraciones de AFP superiores a $712,94 \pm 188,49$ ng/ml, el índice de estimulación decrece con respecto a la estimulación obtenida con suero autólogo. A medida que aumenta la concentración de AFP en el cultivo, el índice de estimulación tiende a disminuir TABLA 17, concentraciones de AFP inferiores a $712,94 \pm 188,49$ ng/ml de cultivo, no ejercen efecto inhibitorio

Por otro lado, se procedió a cuantificar por radioinmunoensayo, la concentración de AFP de los distintos sueros de mujeres embarazadas empleados en experimentos anteriores, con el fin de realizar un estudio comparativo entre las modificaciones en los índices de estimulación producidos por AFP purificada y las producidas por suero de gestantes a concentraciones equivalentes de AFP.

La TABLA 18, expone los valores de AFP determinados en los sueros de mujeres grávidas, ordenados según los periodos gestacionales a los cuales fueron extraídos.

A continuación se realizó un estudio de la respuesta de linfocitos T con sueros de mujeres gestantes, según el periodo gestacional y su contenido en AFP. En la TABLA 19, se observa que la máxima inhibición o el menor índice de estimulación, se obtiene entre la 20 y 30 semanas de gestación (2º periodo). Sueros pertenecientes al 1º y 3º periodo, ejercen efectos inhibitorios comparables entre sí, a pesar de que las concentraciones de AFP en ambos periodos son muy diferentes. Por otro lado, la divergencia en el índice de estimulación de los dos últimos periodos es estadísticamente significativa, aunque la concentración de AFP es muy similar.

La TABLA 20, presenta las medias de los índices de estimulación obtenidos en cultivos de linfocitos T estimulados con PHA, incubados en presencia de sueros de mujeres embarazadas o AFP purificada.

FIGURA VIII

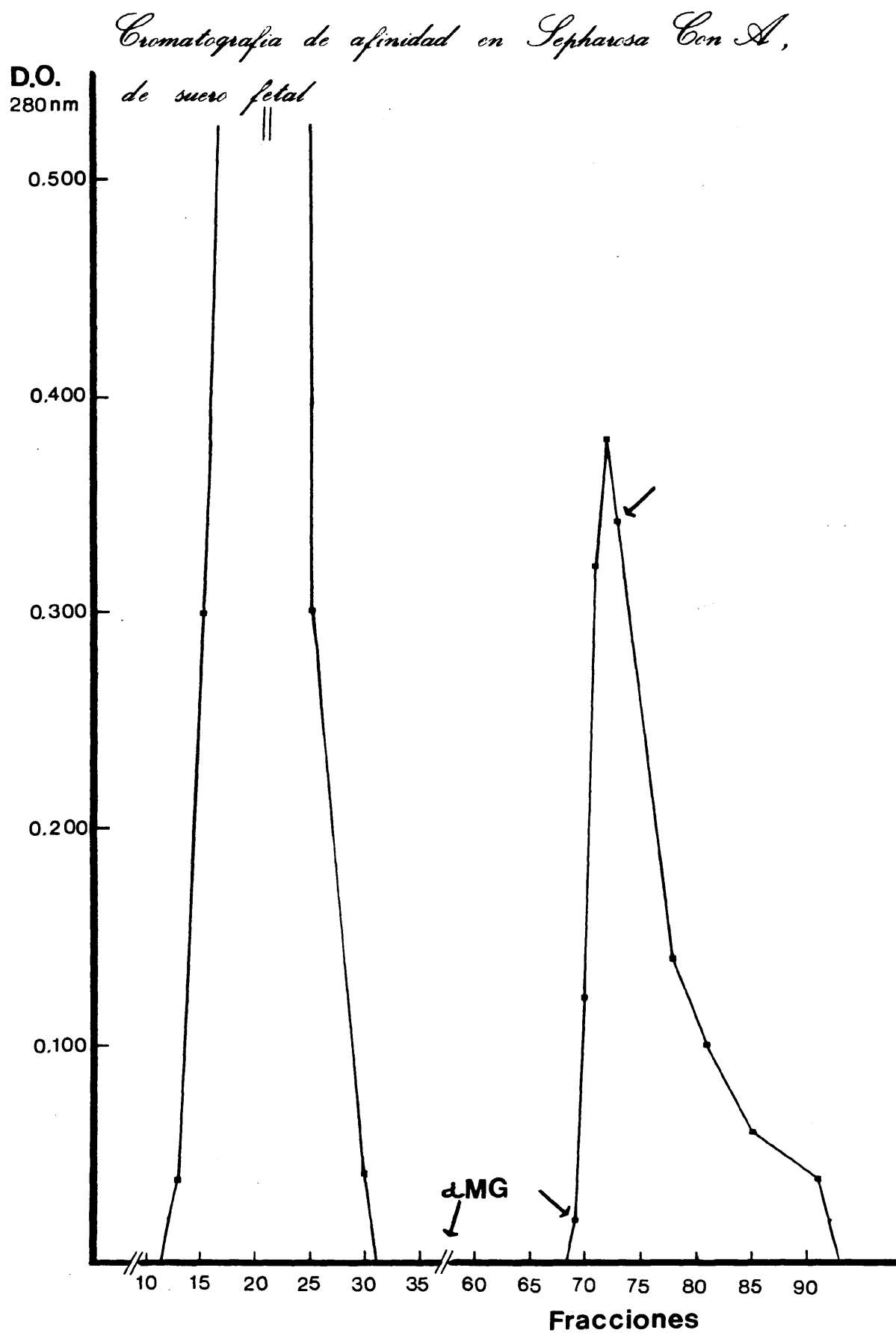


FIGURA IX

INMUNODIFUSION DOBLE BIDIMENSIONAL de las fracciones
obtenidas de suero fetal, positivas en AFP, detectadas
frente a suero anti-AFP



FIGURA X

INMUNODIFUSION DOBLE BIDIMENSIONAL de las fracciones
de suero fetal frente a suero anti-humano

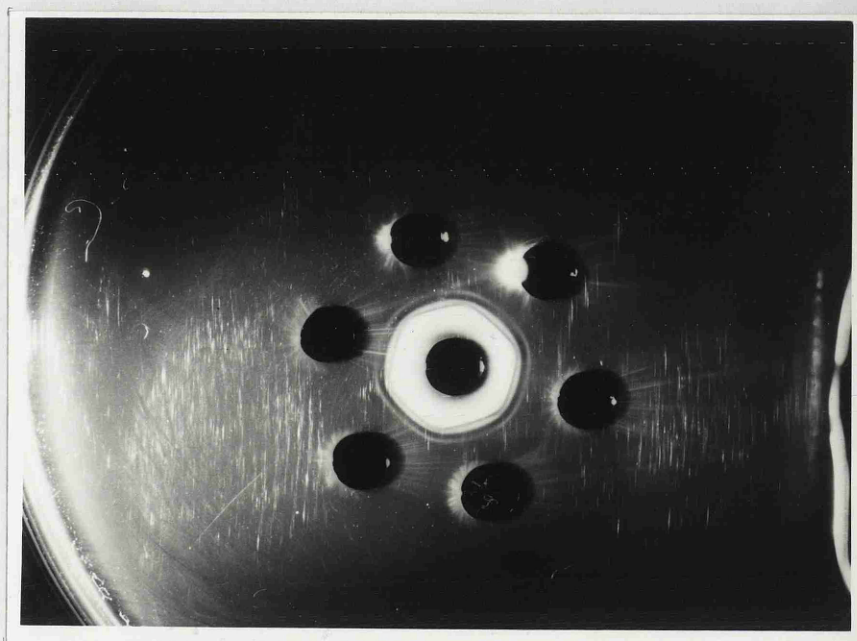
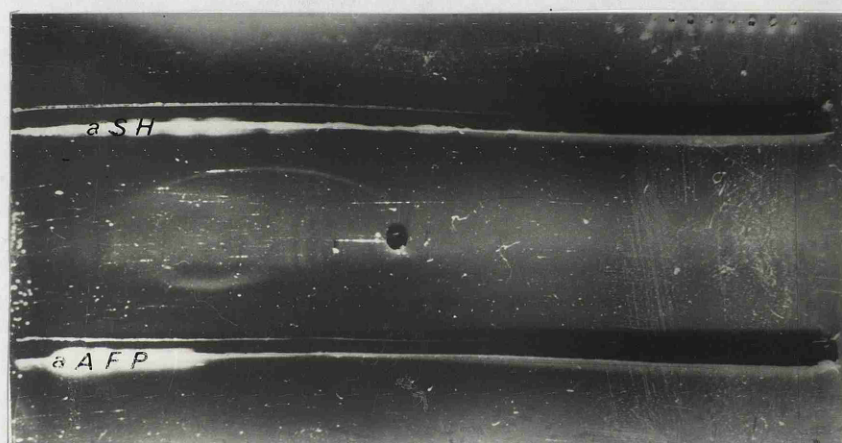


FIGURA XIINMUNOELECTROFORESIS

Pocillo central: fracciones positivas en AFP obtenidas
de suero fetal

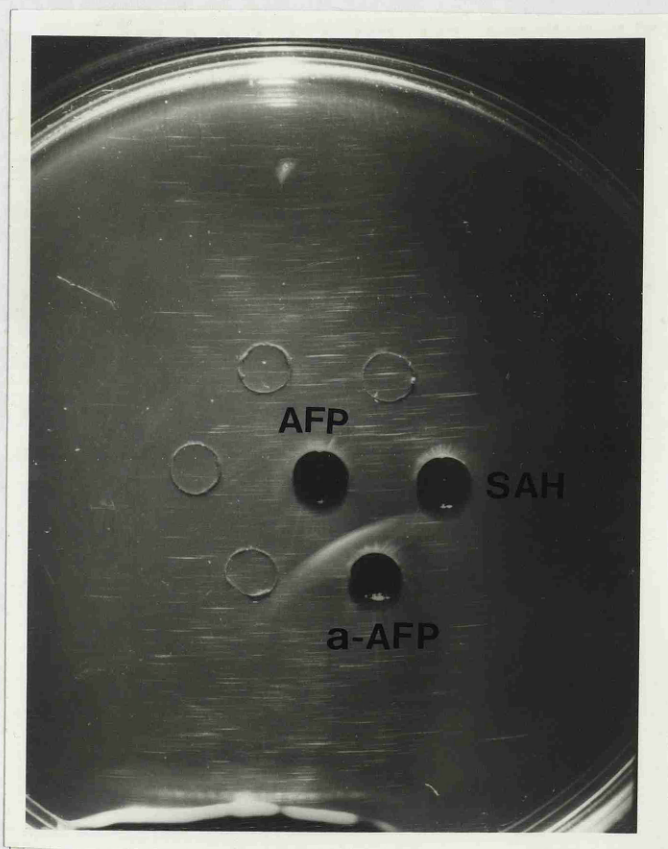
Trinchera superior: suero anti-humano

Trinchera inferior: suero anti-AFP



F I G U R A XII

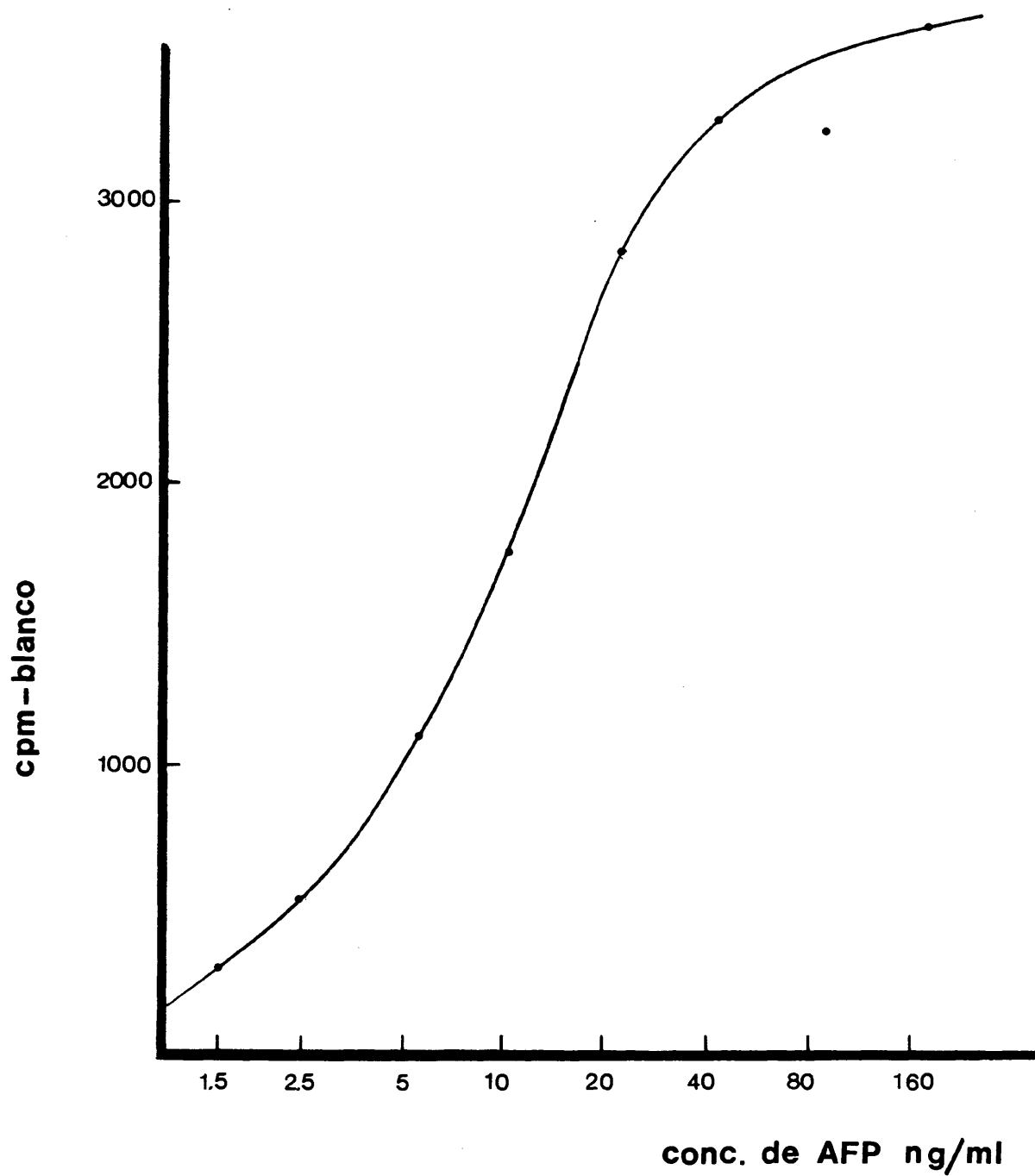
INMUNODIFUSION DOBLE BIDIMENSIONAL de las muestras
de AFP purificadas, detectadas frente a suero anti-AFP
y suero anti-humano



AFP ng/ml	cpm	cpm	MEDIA	MEDIA-BLANCO
160	6.049	5.931	5.990	3.619
80	5.078	6.324	5.701	3.330
40	5.956	5.567	5.761	3.390
20	5.596	5.062	5.329	2.958
10	4.253	4.277	4.265	1.894
5	3.530	3.488	3.509	1.138
2,5	3.105	2.724	2.914	543
1,5	2.954	2.236	2.595	224
BLANCO	2.514	2.288	2.371	
CONTROL	169000	171000	170000	
r=0,85				

FIGURA XIII

Curva estandar : R.I.A de AFP

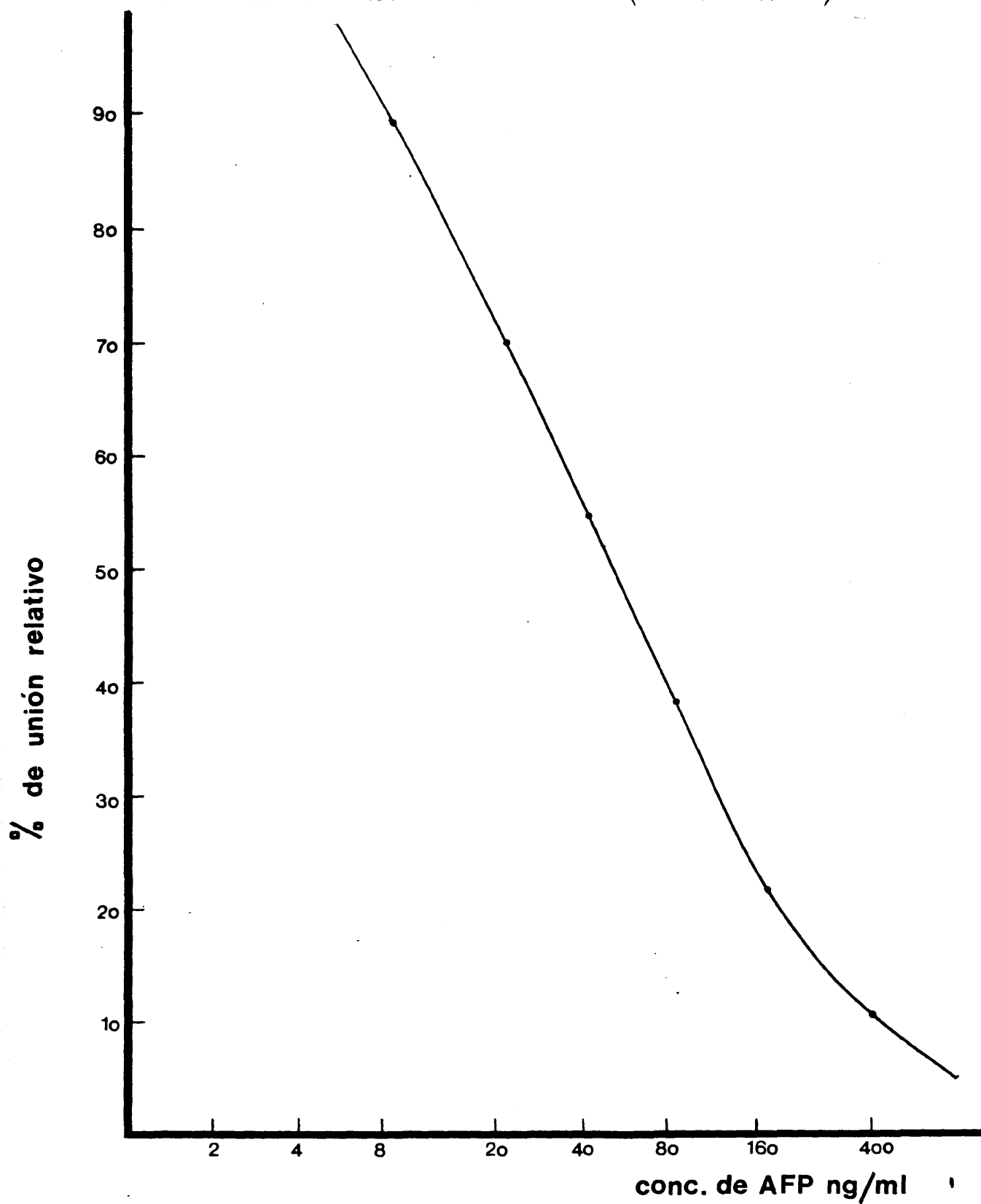


AFP ng/ml	cpm	cpm	MEDIA	% DE UNION RELATIVO
8	9.378	9.421	9.399	89
20	8.001	7.444	7.722	70
40	6.089	6.244	6.165	53
80	4.480	4.817	4.648	37
160	3.246	3.319	3.282	22
400	2.106	2.209	2.157	10
BLANCO(B)	10.496	10.285	10.390	
CONTROL(C)	10.375	13.283	11.829	
SEROTEST	5.400	5.408	5.404	45
NSB	1.181	1.282	1.231	

$$\% \text{ UNION MAXIMO} = \frac{B-NSB}{C} \times 100 = 77\%$$

FIGURA XIV

Curva estandar: R.I.A de AFP (método comercial)



T A B L A 16

MUESTRAS DE ALFA-FETOPROTEINA PURIFICADAS, OBTENIDAS

DE SUERO FETAL

<u>MUESTRA</u>	<u>CONCENTRACION $\mu\text{g/ml}$</u>
----------------	--

AFP-1	77,19
AFP-2	52,00
AFP-3	59,76
AFP-4	75,00
AFP-5	7,81
AFP-6	77,19
AFP-7	37,00
AFP-8	5,81
AFP-9	6,11
AFP-10	52,00
AFP-11	170,00
AFP-12	13,01
AFP-13	23,00
AFP-14	3,40
AFP-15	211,69
AFP-16	32,00
AFP-17	52,29
AFP-18	3,40
AFP-19	14,40
AFP-20	84,66
AFP-21	6,11
AFP-22	92,13
AFP-23	7,26
AFP-24	25,00
AFP-25	22,00
AFP-26	65,00
AFP-27	10,26
AFP-28	75,00
AFP-29	8,37

.../...

.../... TABLA 16-continuación

MUESTRA	CONCENTRACION $\mu\text{g/ml}$
AFP-30	47,60
AFP-31	2,65
AFP-32	94,62
AFP-33	39,84
AFP-34	161,85
AFP-35	3,73
AFP-36	4,46
AFP-37	4,81
AFP-38	32,00
AFP-39	14,00
AFP-40	2,90
AFP-41	20,00
AFP-42	2,91
AFP-43	36,00
AFP-44	6,53
AFP-45	4,16
AFP-46	5,81
AFP-47	17,70
AFP-48	10,31
AFP-49	24,00
AFP-50	21,00
AFP-51	7,50
AFP-52	16,00
AFP-53	14,40
AFP-54	19,40
AFP-55	9,06
AFP-56	2,91
AFP-57	8,90
AFP-58	16,60
AFP-59	8,26

.../...

.../... TABLA 16-continuación

<u>MUESTRA</u>	<u>CONCENTRACION $\mu\text{g/ml}$</u>
AFP-60	8,60
AFP-61	4,90
AFP-62	5,70
AFP-63	6,30
AFP-64	4,10
AFP-65	17,20
AFP-66	25,00
AFP-67	42,00
AFP-68	8,85
AFP-69	8,40

DE ALFA FETOPROTEINA (AFP) PURIFICADA

CONCENTRACION DE AFP ng/ml $\bar{x} \pm \sigma$	Nº DE EXP.	INDICE DE ESTIMU - LACION CON SA $\bar{x} \pm \sigma$	P	INDICE DE ESTIMU - LACION CON AFP $\bar{x} \pm \sigma$	P'	iAFP/iSA
3,82 \pm 3,85	45	500,93 \pm 202,27	N.S.	424,55 \pm 192,00	N.S.	0,84
30,26 \pm 13,56	26	602,30 \pm 219,88	N.S.	491,75 \pm 228,21	N.S.	0,81
87,69 \pm 14,52	13	580,53 \pm 208,22	N.S.	523,53 \pm 168,59	N.S.	0,90
201,81 \pm 73,20	17	479,41 \pm 270,73	N.S.	401,41 \pm 239,03	N.S.	0,83
712,94 \pm 188,49	18	376,33 \pm 185,18	<0,01	210,83 \pm 156,29	<0,05	0,53
1516,30 \pm 299,33	20	359,40 \pm 93,08	<0,01	171,05 \pm 86,53	<0,05	0,47
2778,43 \pm 530,51	16	348,56 \pm 188,29	<0,01	137,06 \pm 197,27	N.S.	0,39
5689,33 \pm 1230,93	15	407,06 \pm 181,85	<0,05	169,00 \pm 201,51	N.S.	0,41
TOTAL	170					

P= Significación estadística entre los grupos de estimulación con suero autólogo (SA) y AFP purificada

P'= Significación estadística del aumento en la concentración de AFP purificada

T A B L A 18

NIVELES SERICOS DE AFP EN DISTINTAS SEMANAS DE GESTACION

DETERMINADOS POR RADIOINMUNOENSAYO8-20 SEMANAS

<u>SUEROS</u>	<u>SEMANAS</u>	<u>CONCENTRACION DE AFP (ng/ml)</u>

127-129	8	12,50
127-115	10	9,20
127-121	10	20,00
127- 58	12	13,00
127-124	12	90,00
127- 46	13	8,00
127-131	13	91,75
127- 42	15	28,00
127-119	16	24,00
127-138	16	36,00
127-116	16	38,00
127-148	16	40,00
127-109	16	48,00
127-136	16	60,00
127- 29	17	25,00
127- 39	18	22,00
127- 20	19	55,00
127-150	20	18,80
127-126	20	28,00

nº total de casos = 19

media $\pm \sigma$ = 35,07 \pm 24,56

.../...

.../... TABLA 18-continuación

20-30 SEMANAS

<u>SUEROS</u>	<u>SEMANAS</u>	<u>CONCENTRACION DE AFP (ng/ml)</u>	
127- 82	22	50,00	
127-106	22	62,00	
127-110	24	140,00	
127-144	24	288,00	
127-120	26	184,00	
127-113	26	208,00	
127-132	28	56,00	
127- 62	28	60,00	
127-102	28	108,00	
127-147	28	204,00	
127-105	30	120,00	

nº total de casos = 11

media $\pm \sigma$ = 134,54 \pm 78,29

.../...

.../... TABLA 18-continuación

30-40 SEMANAS

<u>SUEROS</u>	<u>SEMANAS</u>	<u>CONCENTRACION DE AFP (ng/ml)</u>	
127- 8	32	100,00	
127-140	32	107,00	
127-104	32	120,00	
127-117	32	282,00	
127- 19	32	124,00	
127-134	33	117,00	
127- 83	34	170,00	
127-108	36	55,00	
127- 12	37	80,00	
127- 44	37	270,00	
127-43	40	160,00	

nº total de casos = 11

media \pm = 144,09 \pm 72,71

T A B L A 19

RESPUESTA DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA, INCUBADOS CON SUEROS DE MUJERES

EMBARAZADAS TOMADOS EN DIFERENTES PERIODOS GESTACIONALES

	SEMANAS DE GESTACION	CONCENTRACION DE AFP ng/ml cultivo $\bar{x} \pm \sigma$	P	INDICE DE ESTIMULA- CION CON SA $\bar{x} \pm \sigma$	INDICE DE ESTIMULA- CION CON SE $\bar{x} \pm \sigma$	P	ISE/ISA
1º PERIODO	8-20	3,02±0,65		570,90±288,73	197,88±84,51		0,34
2º PERIODO	20-30	22,55±8,41	<0,01	543,27±133,75	82,00±60,43		0,15
3º PERIODO	30-40	22,27±9,62	N.S.	545,28±241,91	180,37±166,48		0,33

T A B L A 20 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA, E INCUBADOS

CON SUERO DE GESTANTES O AFP PURIFICADA

MUESTRA	Nº DE EXPERIMENTOS	CONCENTRACION DE AFP ng/ml de cultivo $\bar{x} \pm \sigma$	INDICE DE ESTIMULACION (i) $\bar{x} \pm \sigma$	ISE/ISA

SUERO AUTOLOGO	121		491,39±258,67	
SUERO DE GESTANTE	121	22,84± 23,27	113,16±106,45	0,23

SUERO AUTOLOGO	170		483,07±220,82	
AFP PURIFICADA	170	1051,27±972,63	306,05±223,37	0,63

4.3 EFECTO DEL SUERO DE GESTANTES DESPROVISTO DE AFP, SOBRE CULTIVOS DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA

4.3.1 SUERO DE MUJERES GESTANTES DESPROVISTO DE AFP

Dado que el suero completo de mujeres embarazadas, inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos T estimulados con PHA, se procedió a eliminar selectivamente la Alfa-fetoproteína, que según los datos presentes en la literatura, tiene capacidad inmunosupresora durante el embarazo. Para ello se llevó a cabo un estudio comparativo del comportamiento de linfocitos T cultivados en presencia de sueros de mujeres gestantes y en presencia de los mismos sueros desprovistos selectivamente de AFP, mediante inmunoabsorbentes específicos. Como control, se utilizó suero humano normal sometido al mismo tratamiento. Ninguna diferencia significativa fue observada entre la respuesta obtenida con ambas muestras de suero TABLA 21.

4.3.2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se realizó un estudio cinético de citotoxicidad, mediante la liberación de ^{51}Cr en cultivos de linfocitos T cultivados a 6×10^5 células/ml en presencia del 20% de sueros de mujeres embarazadas y de los mismos sueros desprovistos de AFP, frente a controles con suero autólogo.

En la TABLA 22, se recogen los datos obtenidos, los cuales señalan que ninguna de las dos muestras son citotóxicas.

4.3.3 ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES CELULARES

Posteriormente se llevó a cabo un estudio cinético de subpoblaciones celulares, determinadas por anticuerpos monoclonales específicos, en cultivos de células T incubadas a 6×10^5 células/ml, en presencia de ambas muestras de suero; completo y desprovisto de AFP, frente a células controles cultivadas con suero autólogo, con el fin de determinar si el suero de embarazada, ejercía una acción específica sobre alguna subpoblación determinada

de linfocitos T. TABLA 23. Ninguna diferencia significativa, fué observada en la razón T4/T8, tomada a diferentes tiempos de incubación; 24, 48 y 72 horas, entre suero de mujeres embarazadas completo o sin AFP.

4.3.4 FILTRACION A TRAVES DE SEPHADEX G-200 SUPERFINO

El siguiente paso, fué fraccionar el suero de mujeres gestantes desprovisto de AFP, con objeto de probar el efecto de cada una de las fracciones obtenidas, en los cultivos de linfocitos T, estimulados con PHA.

La FIGURA XV , muestra el perfil de elución de una cromatografía en Sephadex G-200 superfino, equilibrado con solución salina pH7,2 ,de 1 ml de suero de gestante sin AFP. Los picos corresponden a las fracciones 19S, 7S y 4S respectivamente.

Del mismo modo, se cromatografiaron muestras de sueros humanos, de sujetos sanos, obteniéndose perfiles de elución, como el que se muestra en la FIGURA XVI.

4.3.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

las fracciones 19S, 7S y 4S, procedentes de sueros normales y sueros de gestantes sin AFP, fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS. La FIGURA XVII, muestra las bandas resultantes, tras aplicar las muestras. No pudiéndose objetivar ninguna diferencia en cuanto a las proteínas contenidas en cada una de las fracciones de suero obtenidas por filtración a través de Sephadex G-200 superfino.

4.3.6 ESTUDIO DE LAS FRACCIONES 19S, 7S Y 4S EN CULTIVOS DE CELULAS T ESTIMULADAS CON PHA

Con el fin de limitar la experimentación, se realizaron una serie de ensayos previos en los cuales se observó que los linfocitos T, se comportan de manera análoga en presencia de las fracciones 19S de sueros humanos normales y sueros de gestantes sin AFP.

Sin embargo, en presencia de las fracciones 7S y 4S, se obtuvieron datos preliminares que merecían ser estudiados más detenidamente. Se probaron distintas concentraciones protéicas y se decidió adoptar el intervalo comprendido entre 240 y 30 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo. FIGURAS XVIII y XIX.

En la TABLA 24, se resumen los datos obtenidos de los cultivos de células T, estimulados con PHA, a una concentración de 6×10^5 células/ml en presencia de las fracciones 7S de suero humano normal (7S-SHN) y 7S de suero de gestantes sin AFP (7S SE-AFP).

Los resultados se expresan como la media de los índices de estimulación obtenidos en cada caso y el cociente entre los índices de estimulación resultantes, de la incubación de los linfocitos T con las fracciones 7S de suero de mujeres grávidas sin AFP y 7S de suero humano normal ($i7S \text{ Se-AFP} / i7S \text{ SHN}$).

La estimulación linfocitaria en presencia de la fracción 7S de sueros de mujeres gestantes desprovistos de AFP, es muy variable de unos cultivos a otros y no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los índices de estimulación obtenidos.

Un estudio similar, se realizó con la fracción 4S de sueros de gestantes sin AFP y sueros humanos normales. TABLA 25 . La respuesta de linfocitos T cultivados en presencia de la fracción 4S de sueros de mujeres embarazadas desprovistos de AFP, está claramente disminuída con respecto a los controles. Es decir dicha fracción tiene un evidente efecto inhibitorio de la proliferación de linfocitos T.

El índice de estimulación de células T en presencia de la fracción 4S, varía inversamente a la concentración protéica presente en el cultivo. A concentraciones superiores a 30 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo, las diferencias en la estimulación linfocitaria, son estadísticamente muy significativas con

respecto a las obtenidas en presencia de la fracción 4S de sueros humanos normales.

En la TABLA 26, se muestra uno de los ensayos realizados con linfocitos T a 6×10^5 células/ml, pertenecientes a un mismo donante, estimulados con PHA, en presencia de la fracción 4S obtenida de un suero de gestante desprovisto de AFP. las concentraciones protéicas utilizadas, se señalan en la columna de la izquierda. El índice de estimulación de los linfocitos incubados con la fracción 4S de suero de embarazada, varía inversamente a la concentración protéica. A 30 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo, la inhibición de la respuesta proliferativa desaparece.

El grado de estimulación, es muy variable cuando la concentración protéica de la fracción 4S añadida al cultivo es 30 $\mu\text{g/ml}$ TABLA 27.

Sin embargo, la inhibición de la proliferación linfocitaria producida por 240 $\mu\text{g/ml}$ de la fracción 4S, se mantiene casi constante a lo largo de los cultivos realizados, con linfocitos procedentes de distintos donantes TABLA 28.

4.3.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LA FRACCION 4S

La implacable inhibición efectuada por la fracción 4S de sueros de mujeres gestantes, no es debida a que se trate de una sustancia citotóxica TABLA 29.

4.3.8 EFFECTO DE LA FRACCION 4S EN CULTIVOS MIXTOS HETEROLOGOS

En la TABLA 30, se muestran los resultados obtenidos de la incubación de células T y B procedentes de dos sujetos diferentes a 1×10^6 células/ml, respectivamente, en presencia de la fracción 4S de suero de mujeres embarazadas desprovisto de AFP y suplementados con 0,5%(v/v) de una mezcla de suero humano normal. Los datos se representan mediante la incorporación de timidina tritiada en $\text{cpm} \pm \sigma$ y por el cociente de los ín_

lices de estimulación de la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP y de la la fracción 4S de suero humano normal (i4S SE-AFP/i SHN). Señalando que la fracción 4S, ejerce también acción inhibidora sobre cultivos mixtos heterólogos y la inhibición varía inversamente a la concentración protéica presente en el cultivo. Lo cual implica que su mecanismo de acción no es por unión o interferencia con el mitógeno.

4.3.9 ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES CELULARES EN CULTIVOS DE LINFOCITOS T INCUBADOS CON LA FRACCION 4S DE SUERO DE GESTANTES DESPROVISTO DE AFP

Cuantitativamente, no se observó diferencia alguna con los niveles normales, en los porcentajes de subpoblaciones celulares cuantificados por anticuerpos monoclonales específicos TABLA 31.

4.3.10 ANALISIS CUALITATIVO DE LA FRACCION 4S DE SUERO DE GESTANTES DESPROVISTO DE AFP

Al analizar las fracciones 4S, mediante inmunolectroforesis en agar, frente a suero anti-humano, se objetivan dos bandas de precipitación de movilidades α_2 , β_1 , en la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP, que están ausentes en la fracción 4S de suero humano normal FIGURA XX.

La inmunodifusión doble bidimensional de cada una de éstas fracciones frente a anti-sueros específicos de proteínas relacionadas con el embarazo revela: reacción negativa de ambas fracciones con anti- β_1 glicoproteína humana específica del embarazo y con anti- α_2 glicoproteína asociada al embarazo (Behring Institut). Frente a suero anti- α_1 glicoproteína ácida humana (Behring Institut), se produce reacción de precipitación en ambas fracciones. Finalmente, con suero anti-ceruloplasmina (Behring Institut), la reacción es positiva en ambas fracciones, siendo más intensa en la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP FIGURAS XXI y XXII.

El análisis inmunoelectroforético de la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP frente a suero anti-ceruloplasmina, no revela ninguna banda de precipitación FIGURA XXIII.

La inmunoelectroforesis de la fracción 4S de suero de mujeres grávidas desprovisto de AFP, frente a suero anti-alfa₁glicoproteína, revela una banda de precipitación no correspondiente a la movilidad alfa₁. FIGURA XXIV. Con el fin de aclarar el cambio de movilidad, se realizó otra inmuno-electroforesis de las fracciones 4S de suero humano normal y 4S de suero de embarazada sin AFP, frente al mismo antisuero, FIGURA XXV, revelandose dos bandas correspondientes a dicha proteína, con movilidad diferente.

T A B L A 21 EFECTO DEL SUERO DE MUJERES EMBARAZADAS COMPLETO (SE) Y DESPROVISTO DE ALFA-FETOPROTEINA
(SE-AFP), SOBRE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA

<u>SUERO</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Nº DE CASOS</u>	<u>INDICE DE ESTIMULACION</u>	<u>P</u>
			$\bar{x} \pm \sigma$	

SHN	—	10	268,83 \pm 108,39	
SHN	Inmunoadsorbente anti-AFP	10	269,22 \pm 148,96	N.S.

SE	—	10	156,91 \pm 47,18	
SE-AFP	Inmunoadsorbente anti-AFP	10	159,17 \pm 72,70	N.S.

EMBARAZADAS COMPLETO (SE) O DESPROVISTO DE AFP (SE-AFP)

		% DE LIBERACION DE ^{51}Cr ($\bar{x} \pm \sigma$)			
MUESTRA	<div></div>	TIEMPO DE CULTIVO	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS

SE			$-0,25 \pm 4,64$	$-5,7 \pm 2,18$	$0,50 \pm 1,38$
SE-AFP			$3,05 \pm 2,15$	$-0,6 \pm 0,31$	$-0,09 \pm 0,31$

T A B L A 23 ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES CELULARES DE LINFOCITOS T CULTIVADOS EN PRESENCIA DE SUERO

DE MUJERES EMBARAZADAS COMPLETO O DESPROVISTO DE AFP

SUERO	Tº DE CULTIVO horas	% OKT 3 $\frac{\bar{x} \pm \sigma}{}$	% OKT 4 $\frac{\bar{x} \pm \sigma}{}$	% OKT 8 $\frac{\bar{x} \pm \sigma}{}$	T4/T8

SA	24	81,00 \pm 10,58	55,70 \pm 8,62	36,76 \pm 6,09	1,51
SA	48	61,55 \pm 17,82	49,07 \pm 9,36	34,29 \pm 7,78	1,43
SA	72	80,68 \pm 10,02	61,88 \pm 17,03	52,98 \pm 19,77	1,16

SE	24	77,00 \pm 7,87	57,55 \pm 9,96	44,75 \pm 9,28	1,28
SE	48	64,64 \pm 16,78	55,80 \pm 4,60	36,96 \pm 5,15	1,50
SE	72	78,28 \pm 11,06	51,30 \pm 2,48	42,46 \pm 7,67	1,20

SE-AFP	24	75,75 \pm 10,50	54,33 \pm 13,93	45,00 \pm 11,28	1,20
SE-AFP	48	73,46 \pm 17,82	45,26 \pm 17,34	39,33 \pm 8,77	1,15
SE-AFP	72	63,27 \pm 20,76	59,91 \pm 18,66	51,19 \pm 11,47	1,17

p: no significativo en todos los casos

FIGURA XV

*Filtración de PC-AFP a través de
Sephadex G-200 superfino*

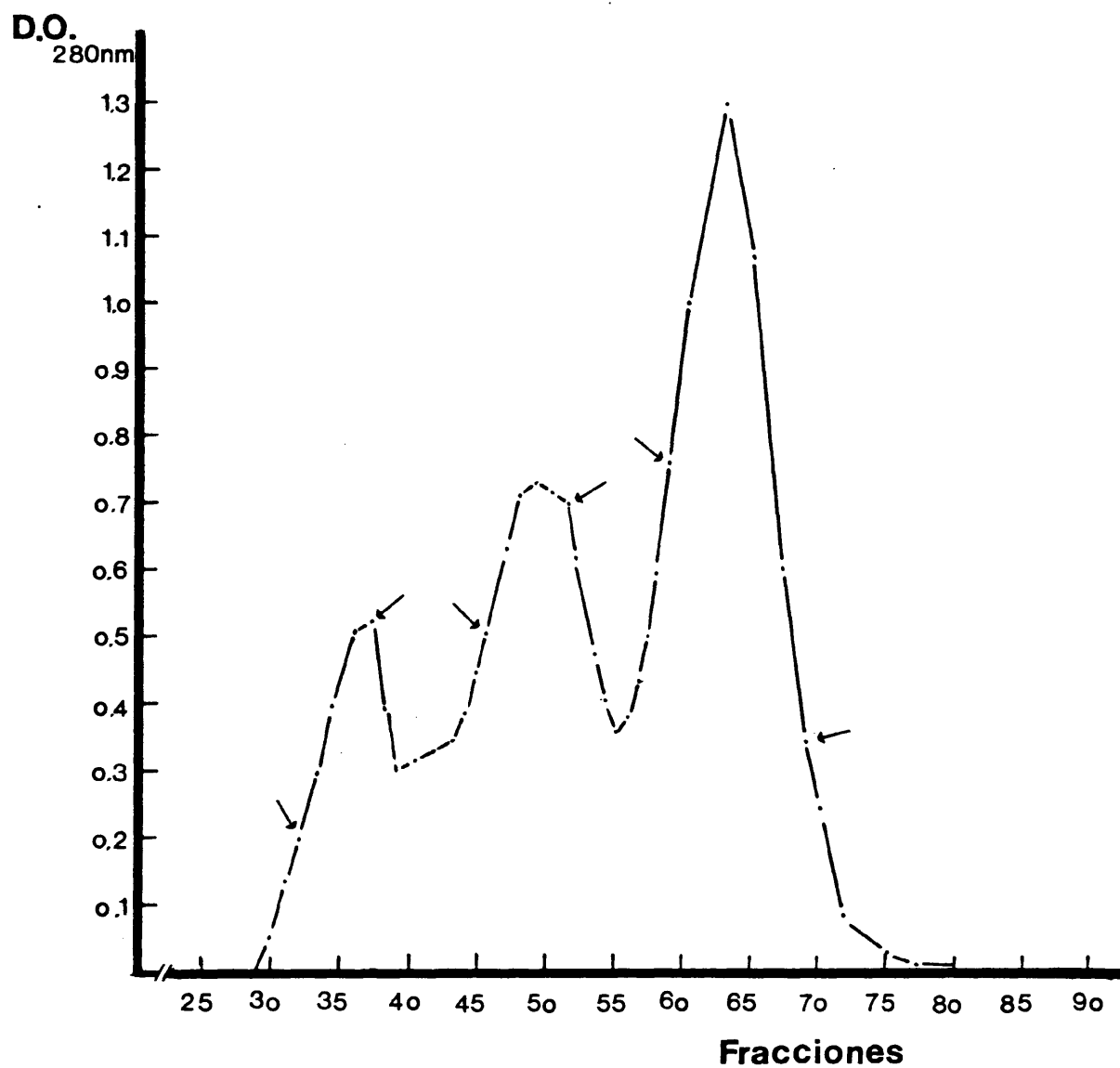
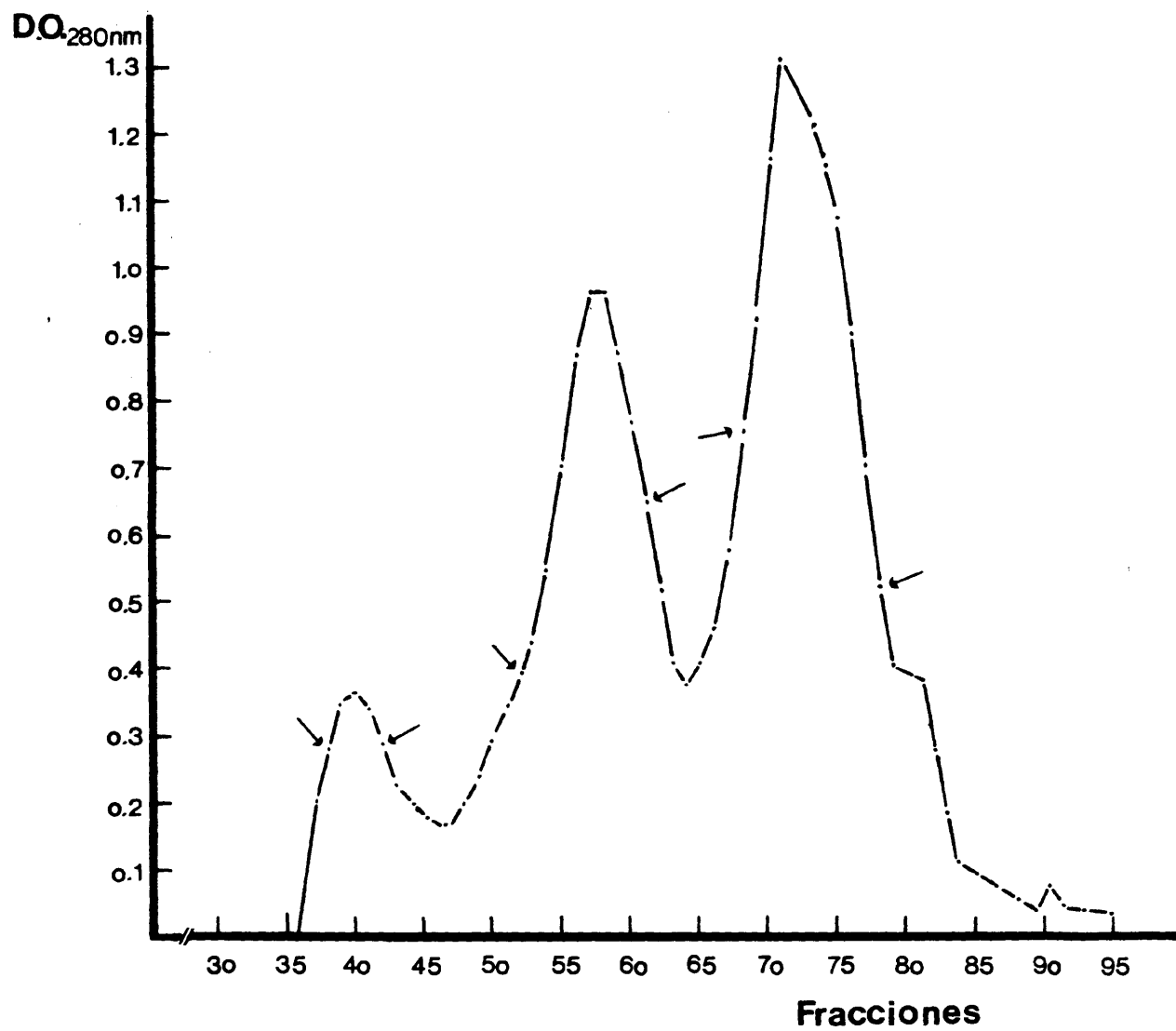


FIGURA XVI

*Filtración de PHN a través de Sephadex G-200
superfino*



SDS de las fracciones de suero de gestantes sin AFP.

De izquierda a derecha: marcadores, fracción 4S de SHN, fracción 4S de SE-AFP, fracción 7S de SHN, en las dos columnas siguientes: fracción 7S de SE-AFP, fracción 19S de SE-AFP, fracción 19S de SHN y por último marcadores que se suceden de abajo a arriba: cadenas ligeras de IgG, ovoalbúmina, cadenas pesadas de IgG y seroalbúmina.



FIGURA XVIII

*Efecto de la fracción 7S de SE-AFP
sobre linfocitos T estimulados con PHA*

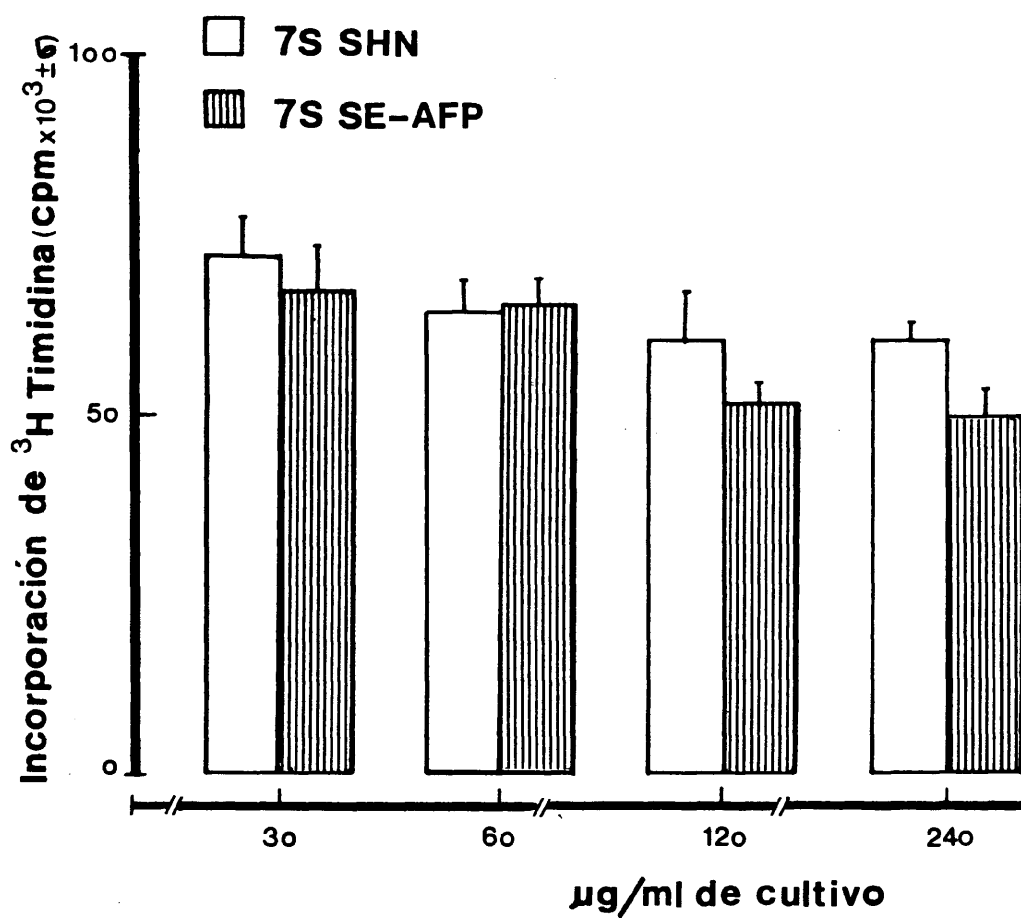
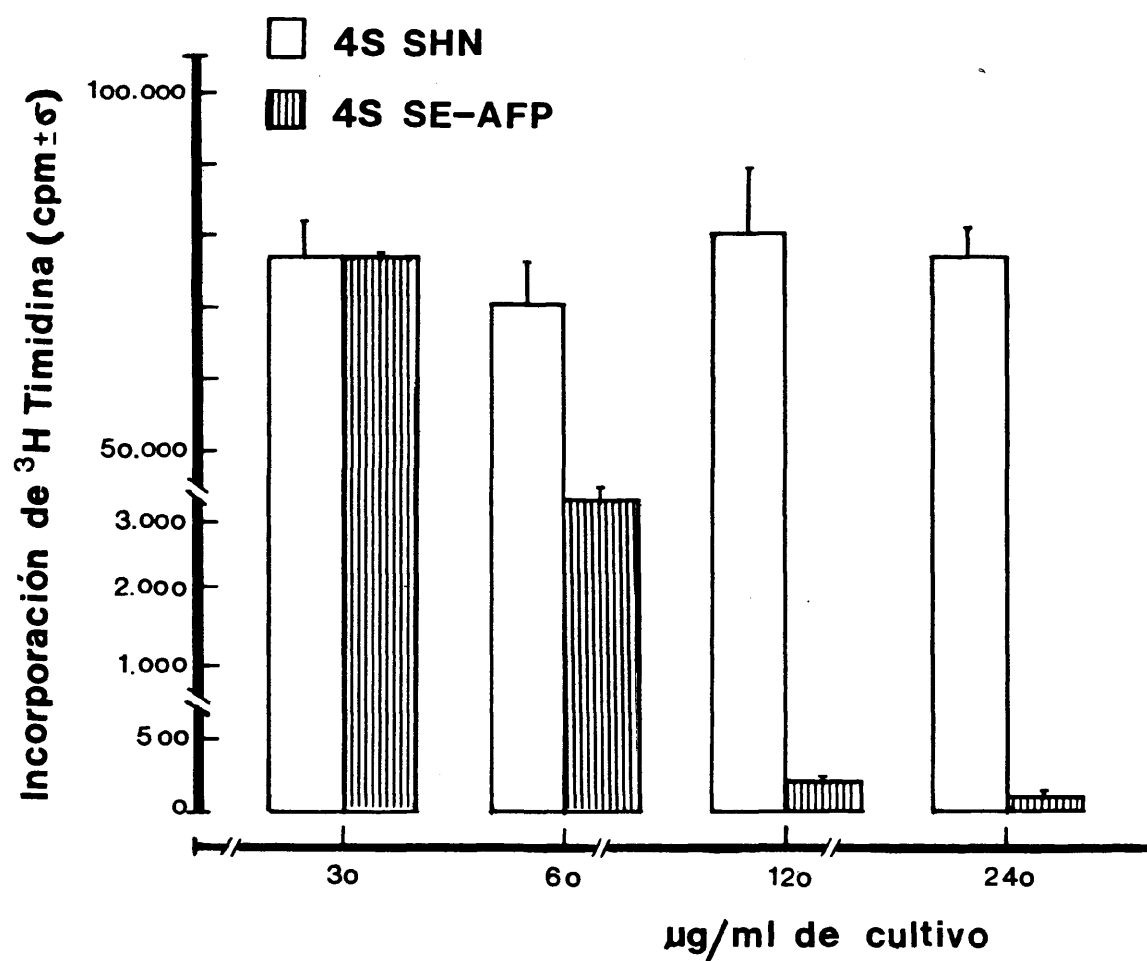


FIGURA XIX

*Efecto de la fracción 4S de SE-AFP
sobre linfocitos T estimulados con PHA*



FRACCION	CONCENTRACION	Nº EXPERIMENTOS	i. ESTIMULACION	P	i7S SE-AFP/i7S SHN
	$\mu\text{g/ml cultivo}$		$\bar{x} \pm \sigma$		

7S SHN	240	17	$553,67 \pm 267,24$		
				N.S.	
7S SE-AFP	240	17	$484,76 \pm 325,15$		0,87

7S SHN	≤ 120	8	$647,58 \pm 140,16$		
				N.S.	
7S SE-AFP	≤ 120	8	$530,17 \pm 164,74$		0,81

T A B L A 25

EFECTO DE LA FRACCION 4S SOBRE CULTIVOS DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA

FRACCION	CONCENTRACION	Nº EXPERIMENTOS	i. ESTIMULACION	P	i4S SE-AFP/i4S SHN
	$\mu\text{g/ml}$ cultivo		$\bar{x} \pm \sigma$		
4S SHN	240	27	$383,06 \pm 355,57$		
4S SE-AFP	240	27	$6,68 \pm 13,33$	$<0,01$	0,01
4S SHN	120	12	$413,45 \pm 363,69$		
4S SE-AFP	120	12	$130,34 \pm 229,59$	$<0,01$	0,31
4S SHN	60	17	$401,36 \pm 542,47$		
4S SE-AFP	60	17	$188,75 \pm 228,37$	$<0,01$	0,47
4S SHN	≤ 30	15	$356,05 \pm 289,57$		
4S SE-AFP	≤ 30	15	$335,66 \pm 175,92$	N.S.	0,94

T A B L A 26 RESPUESTA DE LINFOCITOS T ESTIMULADOS CON PHA, PERTENECIENTES A UN MISMO DONANTE, EN PRESENCIA

DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCION 4S DE SUERO HUMANO NORMAL Y SUERO DE GESTANTES SIN AFP

CONCENTRACION	ALBUMINA HUMANA (AH)	4S SHN	i 4S SHN/i AH	4S SE-AFP	i 4S SE-AFP/IAH			
$\mu\text{g/ml}$ cultivo	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$			
240	83.042 \pm 6.292	697,83	77.310 \pm 4.678	505,29	0,72	146 \pm 60	1,33	0,0019
120	72.884 \pm 4.317	495,80	80.684 \pm 9.967	431,46	0,87	179 \pm 23	1,77	0,0035
60	75.209 \pm 6.511	442,60	70.775 \pm 6.610	402,13	0,90	3.320 \pm 240	44,26	0,1000
30	78.943 \pm 6.429	404,42	77.565 \pm 5.765	385,89	0,95	77.076 \pm 383	383,46	0,9400

DE 30 µg/ml DE CULTIVO DE LA FRACCION 4S DE UN SUERO DE GESTANTE SIN AFP

DONANTE	ALBUMINA HUMANA (AH)	4S SHN	i 4S SHN/i AH	4S SE-AFP	i4S SE-AFP/iAH			
	$\overline{cpm} \pm \sigma$	\overline{i}	$\overline{cpm} \pm \sigma$	\overline{i}	$\overline{cpm} \pm \sigma$			
1	56.058±9.305	264,42	59.857±7.921	321,81	1,21	25.703±1.694	119,74	0,45
2	26.670±1.385	290,64	23.982±4.567	363,00	1,24	29.057±4.699	440,25	1,51
3	40.483±5.880	302,11	42.090±4.152	300,64	0,99	43.449±6.121	310,24	1,02
4	63.394±6.645	763,78	58.875±6.291	709,33	0,92	50.189±2.092	590,40	0,77
5	69.099±3.962	405,87	62.622±6.977	380,81	0,93	68.801±8.109	378,02	0,93

DE 240 $\mu\text{g/ml}$ DE CULTIVO DE LA FRACCION 4S DE UN SUERO DE GESTANTE SIN AFP

DONANTE	ALBUMINA HUMANA (AH)	4S SHN	i 4S SHN/i AH	4S SE-AFP	14S SE-AFP/1AH	
	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$	$\overline{\text{cpm}} \pm \sigma$		
1	50.195 \pm 2.973	497,55	47.559 \pm 4.779	428,45	0,86	0,001
2	53.860 \pm 4.056	368,90	40.161 \pm 8.486	349,22	0,94	0,005
3	65.796 \pm 8.992	466,63	66.230 \pm 7.461	439,78	0,94	0,006
4	25.603 \pm 2.207	153,31	31.068 \pm 4.947	166,13	1,08	0,006

LA FRACCION 4S DE SUERO DE GESTANTES SIN AFP

		% DE LIBERACION DE ⁵¹ Cr ($\bar{x} \pm \sigma$)			
MUESTRA	TIEMPO DE CULTIVO				
		24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS	

ALBUMINA HUMANA		-1,98 \pm 0,18	2,97 \pm 1,83	2,38 \pm 1,51	
4S SHN		-2,08 \pm 7,49	-0,56 \pm 1,90	3,73 \pm 16,03	
4S SE-AFP		2,29 \pm 1,98	2,55 \pm 2,62	-2,20 \pm 11,95	

T A B L A 30

CULTIVOS MIXTOS HETEROLOGOS EN PRESENCIA DE LA FRACCION 4S DE SUEROS DE GESTANTES

SIN AFP

FRACCION	CONCENTRACION	Nº EXPERIMENTOS	INCORPORACION DE ³ H TIMIDINA	¹⁴ S SE-AFP/ ¹⁴ S SHN
	µg/ml cultivo		cpm±σ	
4S SHN	240	5	26.859,66±12.021,91	
4S SE-AFP	240	5	249,66±	107,22
4S SHN	120	5	22.724,38±	1.670,01
4S SE-AFP	120	5	482,50±	27,57
4S SHN	60	4	19.425,31±	8.361,68
4S SE-AFP	60	4	7.058,37±	9.047,05
				0,36

DE 240 µg/ml DE CULTIVO DE LA FRACCION 4S DE SUERO DE MUJERES EMBARAZADAS SIN AFP

MUESTRA	Tº DE CULTIVO horas	%OKT 3		%OKT 4		%OKT 8		T4/T8
		$\bar{x} \pm \sigma$		$\bar{x} \pm \sigma$		$\bar{x} \pm \sigma$		
ALBUMINA	24	67,19±16,05		55,83± 7,11		37,93± 6,64		1,47
ALBUMINA	48	61,48±15,56		49,65±19,60		38,36±12,00		1,09
ALBUMINA	72	72,33± 9,50		64,33± 6,11		46,00± 9,53		1,39
4S SHN	24	59,01±10,54		52,17± 2,73		44,10± 4,47		1,18
4S SHN	48	52,22±16,80		50,31±15,26		45,87±16,26		1,09
4S SHN	72	66,66±26,63		69,33± 7,09		46,66±13,05		1,48
4S SE-AFP	24	65,37±13,72		57,18± 6,39		42,00±11,53		1,36
4S SE-AFP	48	59,75±17,89		50,78±13,24		37,75±13,42		1,34
4S SE-AFP	72	87,66± 5,03		64,00± 2,64		52,00±12,12		1,42

p: no significativo en todos los casos

FIGURA XXINMUNOELECTROFORESIS

Trinchera : suero anti-humano

Pocillo superior : fracción 4S de suero humano normal

Pocillo inferior : fracción 4S de suero de gestante
desprovisto de Alfa-fetoproteína

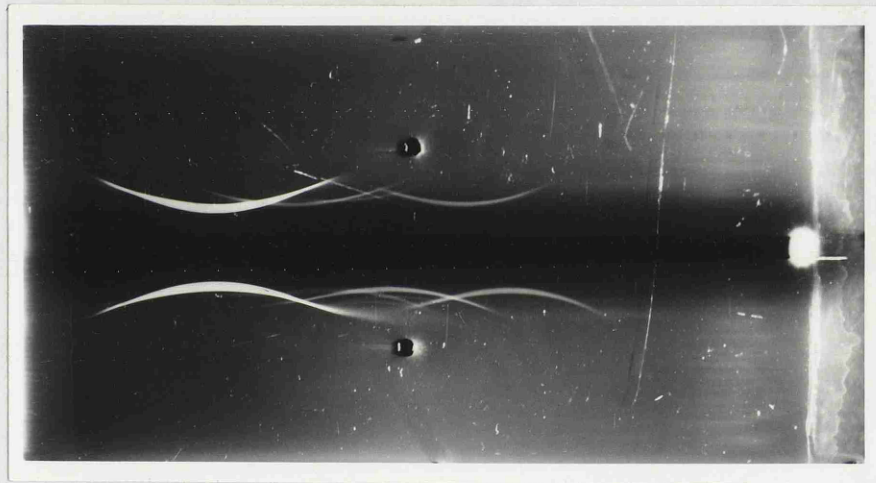
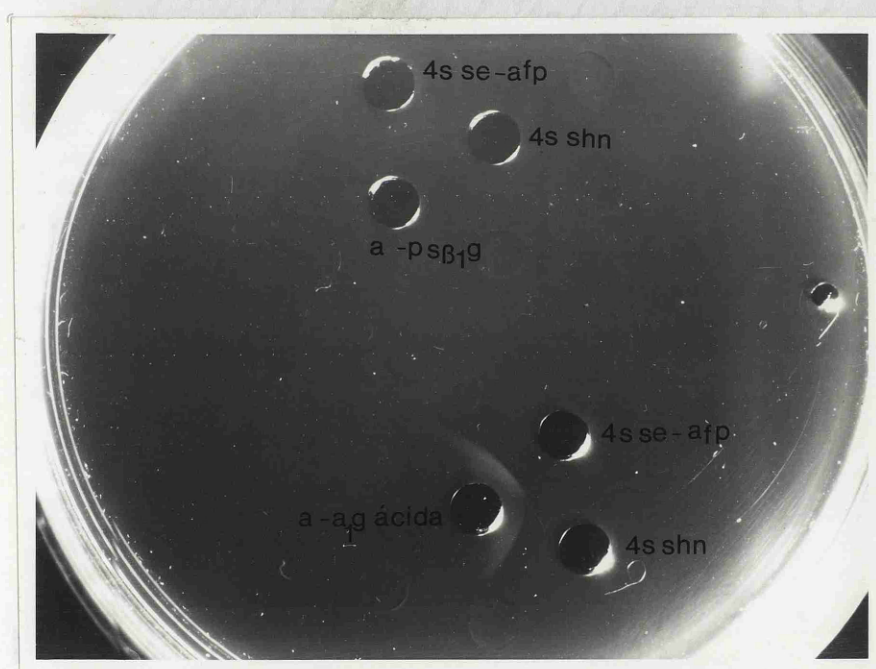


FIGURA XXI

INMUNODIFUSION DOBLE BIDIMENSIONAL de las fracciones 4S SHN y 4S SE-AFP frente a suero anti-B₁ glicoproteína (PSB₁G) y frente a suero anti-alfa₁ glicoproteína ácida (a₁-G ácida)



F I G U R A XXII

INMUNODIFUSION DOBLE BIDIMENSIONAL de las fracciones

4S SHN y 4S SE-AFP frente a suero anti-ceruloplasmina
(CER) y frente a suero anti-alfa₂glicoproteína
a₂PAG

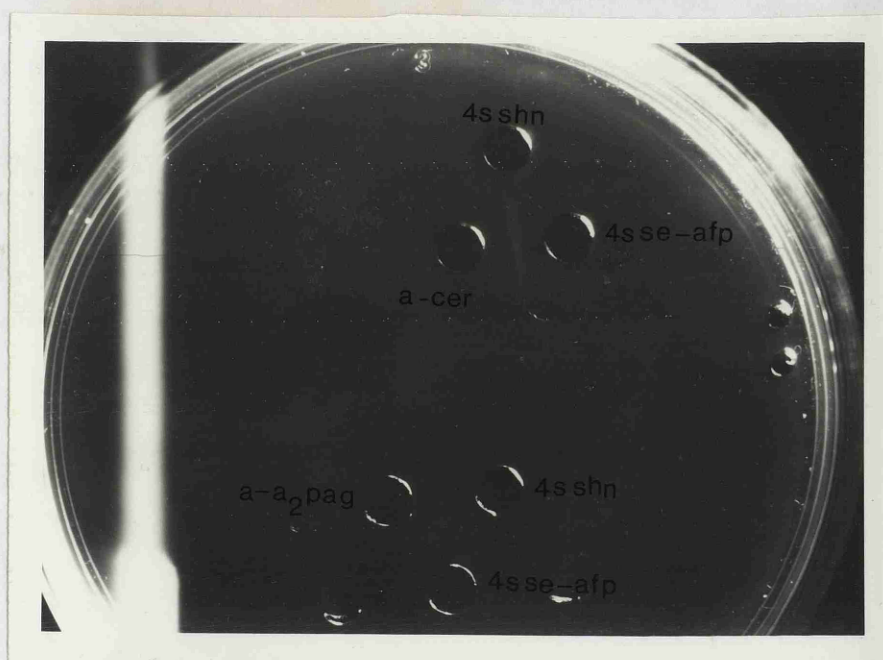


FIGURA XXIIIINMUNOELECTROFORESIS

Pocillo central : fracción 4S SE-AFP

Trinchera superior : suero anti-humano

Trinchera inferior : suero anti-ceruloplasmina

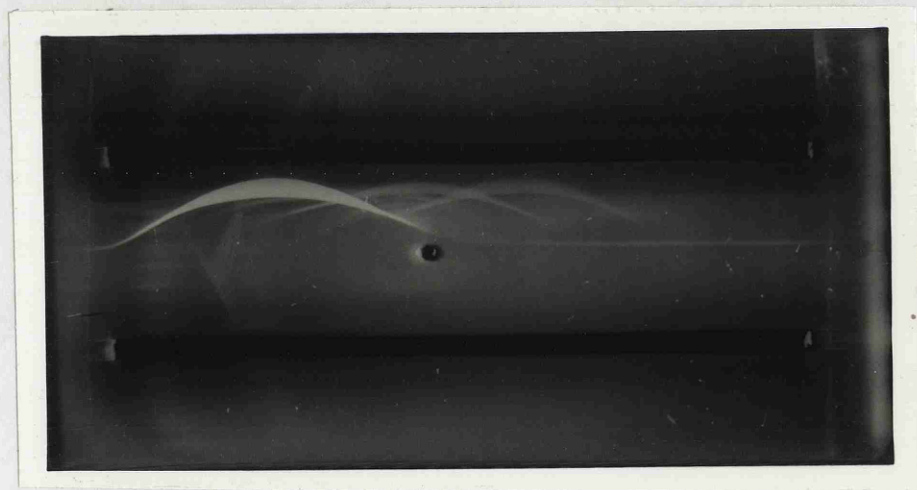


FIGURA XXIV

INMUNOELECTROFORESIS

Pocillo central : fracción 4S SE-AFP

Trinchera superior : suero anti-humano

Trinchera inferior : suero anti-alfa₁-glicoproteína

ácida

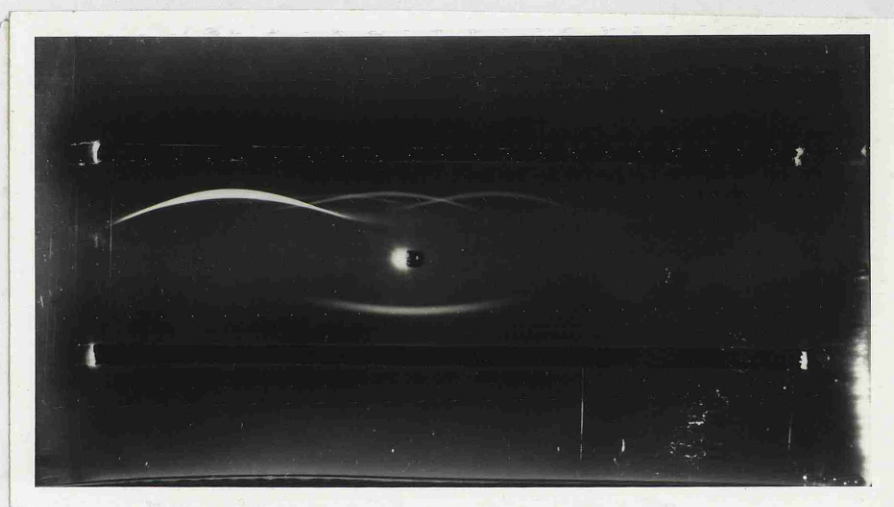


FIGURA XXV

INMUNOELECTROFORESIS

Pocillo superior : fracción 4S SHN

Pocillo inferior : fracción 4S SE-AFP

Trinchera central : suero anti- α_1 -glicoproteína
ácida



4.4 CULTIVOS DE CELULAS T INCUBADAS EN PRESENCIA DE AFP PURIFICADA Y DE LA FRACCION 4S DE SUERO DE GESTANTES DESPROVISTO DE AFP

Con el fin de investigar si la AFP tenía algún efecto cooperativo con las proteínas inhibidoras de la respuesta proliferativa de linfocitos T, localizadas en la fracción 4S de sueros de gestantes, se realizó un estudio de estimulación de células T, en presencia de cantidades variables de ambas muestras protéicas. La TABLA 32, recoge los resultados obtenidos de los dieciséis cultivos de células T a 6×10^5 células/ml, estimulados con PHA e incubados con AFP, fracción 4S ó ambas muestras simultáneamente. Las concentraciones de AFP purificada empleadas, son las que normalmente se encuentran en condiciones fisiológicas (no inhibidoras). La concentración de la fracción 4S es de 30 $\mu\text{g/ml}$, es decir aquella a la cual la inhibición de la respuesta proliferativa tiende a desaparecer (Tabla 25).

Los datos muestran que con la adición de AFP, se potencia el efecto inhibitorio, llegando a ser del mismo orden que el observado cuando se empleaban concentraciones mayores de la fracción 4S (Tabla 25).

T A B L A 32

CULTIVOS DE LINFOCITOS T (6×10^5 células/ml) ESTIMULADOS
 CON PHA, E INCUBADOS SIMULTANEAMENTE CON AFP PURIFICADA Y
 30µg/ml DE FRACCION 4S

FRACCION DEL	ALBUMINA HUMANA	AFP PURIFICADA	i. ESTIMULACION	i/i ALBUMINA
SUERO AÑADIDA	µg/ml de cultivo	ng/ml cultivo	$\bar{x} \pm \sigma$	

-	30	-	358,87 ± 125,77	
-	-	10	293,63 ± 165,01	0,81
-	-	20	227,90 ± 89,43	0,63
-	-	40	205,41 ± 147,88	0,57
4S SHN	-	-	304,17 ± 77,42	0,84
4S SHN	0,01	-	314,02 ± 123,50	0,87
4S SHN	0,02	-	294,77 ± 207,08	0,82
4S SHN	0,04	-	353,91 ± 98,32	0,98
4S SHN	-	10	294,83 ± 171,43	0,82
4S SHN	-	20	324,68 ± 297,14	0,90
4S SHN	-	40	287,01 ± 88,02	0,79
4S SE-AFP	-	-	219,60 ± 123,31	0,61
4S SE-AFP	0,01	-	198,79 ± 147,09	0,55
4S SE-AFP	0,02	-	183,20 ± 170,02	0,51
4S SE-AFP	0,04	-	208,08 ± 78,87	0,57
4S SE-AFP	-	10	77,39 ± 50,31	0,21
4S SE-AFP	-	20	70,25 ± 57,92	0,19
4S SE-AFP	-	40	29,75 ± 14,61	0,08

5-DISCUSSION

El embarazo, es un acontecimiento extraordinario desde el punto de vista inmunológico, dado que el organismo materno no produce la inminente reacción de rechazo del feto, como procedería con cualquier genotipo intruso.

A pesar de los numerosos estudios realizados al respecto, dos hechos de capital importancia, permanecen sin esclarecer: la regulación de la respuesta inmune materna y los mecanismos por los cuales el embrión afronta dicha respuesta, siendo capaz de sobrevivir y desarrollarse.

La relación de la madre con el feto, se establece a través de una única estructura anatómica-funcional, la placenta, la cual puede actuar como inmunoabsorbente, impidiendo el paso de los anticuerpos maternos nocivos para el feto o como generador de sustancias inmunodesviantes y agentes supresores característicos del embarazo, que serían los responsables de una regulación específica o inespecífica y bloquearían la reacción a nivel de la fase de reconocimiento o de la etapa efectora de la respuesta inmune.

El presente trabajo, pone de manifiesto la existencia de proteínas asociadas al embarazo, presentes en los sueros de mujeres gestantes, con posible implicación en el fenómeno de inmunoregulación.

El suero, constituye la mejor fuente de estudios del sistema inmune humoral de la mujer embarazada, ya que contiene todas las sustancias circulantes, específicas, generadas durante la gestación.

Por antecedentes bibliográficos, queda testificado, que el suero de mujeres gestantes inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos totales, estimulados mitogénicamente (146).

Con objeto de investigar, si la acción inhibidora del suero

de gestantes, está proyectada sobre una de las poblaciones linfocitarias, se han realizado estudios "in vitro", incubando linfocitos T aislados y cocultivos T:B con sueros de mujeres grávidas y sus respectivos mitógenos.

Los resultados demuestran que el suero de gestantes, inhibe la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA y el índice de estimulación es independiente de la concentración celular presente en el cultivo.

En los datos hay cierta variabilidad. Los índices de estimulación de linfocitos de un mismo donante, incubados con distintas muestras de sueros de gestantes son diferentes, como cabría esperar, dado que la concentración protéica varía de unos sueros a otros. Por otro lado, también difieren las estimulaciones de linfocitos procedentes de diversos sujetos cultivados en presencia de una única muestra de suero. Lo cual probablemente depende de variaciones en las poblaciones linfocitarias probadas o de diferencias antigénicas, puesto que la única variante introducida de un cultivo a otro, son las células procedentes de sujetos diferentes y por consiguiente, con posibles variaciones de contenido en subpoblaciones linfocitarias.

Con respecto al comportamiento celular, cabría pensar que los linfocitos de la mujer grávida, estuvieran funcionalmente disminuídos, como afirman algunos autores (47),(53),(54),(59),(63),(65). Esto explicaría en parte, el fenómeno del no rechazo fetal, ya que al estar el linfocito en condiciones fisiológicas inferiores, no se produciría la señal inductora del mecanismo de defensa contra los antígenos del feto. Sin embargo, el comportamiento de los linfocitos T de mujeres gestantes, cultivados en presencia de otros sueros de mujeres embarazadas, estimulados con PHA, es similar al de los linfocitos de sujetos normales, en las mismas condiciones experimentales. Excluyendo por tanto, cualquier propiedad inherente del linfocito durante el embarazo, responsable en parte, del fenómeno de inhibi_

ción celular. Estas observaciones, están en concordancia con los datos presentes en la literatura (55),(56),(57),(60),(64).

Estos hechos señalan la existencia de factores supresores, presentes en el suero y que dicha supresión no es debida a una alteración particular de la funcionalidad de los linfocitos estudiados.

Con el fin de estudiar, el efecto de la presencia de células B en cultivos de células T, realizados en las condiciones ya descritas, se cultivaron distintas razones T/B con suero de gestantes y se estimularon con PHA o PWM.

El aumento gradual de la concentración de linfocitos B, no produce cambios significativos en la proliferación y el cociente de los índices de estimulación obtenidos con suero de gestante y suero autólogo respectivamente, se mantiene casi constante. Por lo tanto, la presencia de células B en cultivos de linfocitos T estimulados con PHA, no perturba la inhibición ejercida sobre estos últimos.

Según los estudios realizados por Weksler y Gmelig (147),(148), es necesaria la presencia de linfocitos T en cultivos de células B estimulados con PWM, para que dichas células B, proliferen óptimamente.

Cuando el mitógeno utilizado para estimular el cocultivo, es PWM, la inhibición continua manifestandose, lo cual corrobora que la acción del suero de embarazada, está orientada a los linfocitos T y no parece probable que tenga algún efecto sobre los linfocitos B, ya que el incremento progresivo de su concentración celular en el cultivo, no produce variaciones estadística_mente significativas del índice de estimulación.

Estos datos podrían apuntar, que el suero de mujeres gestantes, desempeña su actividad inhibidora sobre los linfocitos T cooperadores, los cuales no darían la señal proliferativa a los linfocitos B y por consi_

guiente, la respuesta global quedaría disminuída.

Con el fin de identificar los factores o proteínas del suero de mujeres embarazadas, implicados en el fenómeno de inhibición de la respuesta proliferativa de linfocitos T estimulados con PHA, se llevó a cabo un estudio de una proteína, acerca de la cual, los datos presentes en la literatura son altamente contradictorios. Se trata de la Alfa-fetoproteína, (AFP), cuyo papel biológico, a pesar de los trabajos realizados hasta el momento, permanece oscuro.

Desde su descubrimiento por Bergstrand y Czar (90),(91),(149), se han llevado a cabo numerosas investigaciones, sin que se haya dilucidado su mecanismo de acción. Algunos autores, han demostrado que tanto la AFP humana como murina, tienen propiedades inmunosupresoras, inhibiendo el rechazo inmune del feto por la madre (125),(120),(127),(150),(151),(132),(152) (153). Murgita y colaboradores, afirman que la AFP no bloquea la respuesta de anticuerpos frente a antígenos T independientes y la incubación de AFP con células de bazo de ratón activan las células T supresoras (130),(154). Otros investigadores, no han encontrado que la AFP murina tenga actividad inmunosupresora (122),(129),(131). Algunos estudios, sin embargo, señalan un efecto estimulatorio de esta proteína en cultivos mixtos de linfocitos humanos (101) o sobre la blastogénesis "in vitro" (133).

Recientemente, se ha señalado que la AFP murina actúa preferentemente en aquellas reacciones en las cuales los antígenos de la Clase II están involucrados como determinantes cooperadores en la facilitación de la respuesta inmune (38). Dado que estos antígenos están ausentes en la interfase materno fetal, la AFP no desempeñaría una función directa en la prevención del reconocimiento inmune materno de los antígenos de histocom_

patibilidad fetales, a nivel de la placenta. Sin embargo, no se descarta que pudiera estar implicada en la inducción de mecanismos de supresión no específicos.

Las controversias que existen en cuanto a las propiedades immuno_ supresoras de la AFP, pueden ser debidas al método de aislamiento, empleado por los distintos autores, ya que la AFP se une a otras moléculas de bajo peso molecular como ácidos grasos, poliaminas y cobre. Se ha demostrado (38) que el cobre se une mediante un enlace coordinado a una histidina en posición tres de la porción N-terminal de la AFP y la eliminación del cobre, supone una pérdida en la actividad inhibidora de la proteína. Cualquier método que utilice reactivos de fuerza iónica elevada, implicaría la rotura del enlace , lo cual se traduciría en una disminución de la capacidad supreso_ ra de la proteína.

Por otro lado, las discrepancias en los resultados obtenidos, por los distintos autores, pueden ser debidas a una sustancia contaminante, que esté presente en mayor o menor concentración en las preparaciones de AFP aislada.

Además la AFP, existe en cinco formas o isoproteínas definidas en términos de su movilidad electroforética y su contenido en ácido siálico, de las cuales solo una tiene actividad inhibidora (155),(156). Puede ser que los distintos procesos de aislamiento, favorezcan la obtención de una u otra forma isomérica de esta proteína.

Los resultados expuestos en el presente trabajo, señalan que la AFP purificada por el método descrito, inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos T estimulados con PHA.

La concentración media a partir de la cual se produce inhibición de la proliferación linfocitaria es $712,94 \pm 188,49$ ng/ml de cultivo. Con

concentraciones inferiores, las diferencias obtenidas en los índices de estimulación de las células incubadas con la proteína y suero autólogo respectivamente, no son estadísticamente significativas y el cociente de ambos índices de estimulación es próximo a la unidad. Lo cual sugiere, que existe una dosis mínima necesaria para producir depresión de la respuesta linfocitaria.

El aumento progresivo de la concentración de AFP en el cultivo, no provoca un gradual descenso del índice de estimulación, indicando, que en estas condiciones experimentales, no hay relación cuantitativa entre concentración de proteína y respuesta celular.

La inhibición de la proliferación linfocitaria obtenida, se ha conseguido con concentraciones de AFP muy inferiores a las descritas en la literatura (124). Estos investigadores obtienen depresión de la respuesta de linfocitos T estimulados con PHA con concentraciones superiores a 18.000 ng/ml . Los resultados se inclinan a favor del sistema de aislamiento y purificación introducido en nuestro laboratorio y descartan cualquier pérdida o alteración en las propiedades biológicas de la proteína.

Por otro lado, los datos sugieren, que el descenso en el índice de estimulación con respecto a los controles, se debe a la AFP en sí y no a posibles moléculas de bajo peso molecular, asociadas con ella, ya que casi con toda seguridad, habrían sido eliminadas por diálisis, a lo largo del proceso de obtención y purificación.

Con el fin de relacionar los resultados obtenidos tras la incubación de linfocitos T con suero de mujeres embarazadas y su contenido en AFP, se agruparon los sueros según el periodo de gestación en el cual fueron extraídos. Los datos indican, que la inhibición de la respuesta proliferativa

medida por el índice de estimulación, no es exclusivamente dependiente de la concentración de AFP presente en el cultivo, ya que los índices de estimulación obtenidos en los periodos primero y tercero, son muy similares a pesar de que las concentraciones de AFP son evidentemente distintas. Comparando el segundo con el tercer estadio de gestación, las concentraciones medias de la proteína son casi idénticas, sin embargo, la respuesta proliferativa es significativamente menor en el segundo periodo.

En general, los índices de estimulación de linfocitos T incubados con AFP purificada, son más elevados, en términos absolutos, a pesar de que la concentración protéica es mayor, que los obtenidos con suero de gestantes, cuyo nivel de AFP es mucho menor. En condiciones fisiológicas normales, ningún suero de mujeres embarazadas alcanza concentraciones de AFP tan elevadas, ya que el valor superior medio, viene a ser de $144,09 \pm 72,71$ ng/ml. Aunque la AFP contenida en el suero de gestantes, es insuficiente para producir el efecto supresivo observado en los cultivos "in vitro" de linfocitos T estimulados con PHA e incubados con sueros de gestantes, no se puede decir que dichas concentraciones sean afisiológicas ya que la síntesis local de esta proteína es mucho mayor.

Estos hechos, parecen apuntar, la posibilidad de que la inhibición de la proliferación linfocitaria, sea debida a varios factores interaccionantes, entre los cuales, la AFP podría ser uno de los componentes implicados.

Finalmente, el cultivo de linfocitos T estimulados con PHA e incubados con suero de mujeres embarazadas desprovisto selectivamente de AFP, proporciona resultados similares a los obtenidos con suero de gestantes completo.

Por lo tanto, si la AFP, no es la causante o por lo menos la única responsable del efecto inhibitorio observado, se pone de manifiesto

la existencia en el suero materno de otro u otros factores capaces de deprimir la proliferación linfocitaria "in vitro".

Con objeto de determinar, en que fracción del suero reside la actividad biológica responsable de inhibir la estimulación de linfocitos T, se filtraron las distintas muestras de suero sin AFP, a través de Sephadex G-200 superfino y se estudiaron las fracciones correspondientes a los coeficientes de sedimentación 19S, 7S, y 4S, respectivamente en cultivos de células T estimulados con PHA.

El mismo procedimiento, se llevó a cabo con suero humano normal y la respuesta obtenida se estimó como control.

Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto, que únicamente la fracción 4S de suero de gestantes, tiene un efecto evidente sobre la respuesta linfocitaria al estímulo mitogénico. La fracción 7S produce un ligero descenso del índice de estimulación de los linfocitos, con respecto a la proliferación obtenida con la fracción 7S de suero humano normal, en las mismas condiciones experimentales. Estadísticamente, estas diferencias no son significativas. Probablemente, la pequeña inhibición observada, se debe fundamentalmente a la presencia de proteínas contaminantes de la fracción 4S.

La proliferación de linfocitos T estimulados con PHA e incubados con la fracción 4S de suero de embarazada desprovisto de AFP, está altamente inhibida y las diferencias cuantitativas de los índices de estimulación, con respecto a los controles, son estadísticamente muy significativas. La respuesta proliferativa, varía inversamente con la concentración protéica de dicha fracción, al menos hasta la concentración mas alta probada, que fue de 240 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo. A medida que disminuye la concentración, el

índice de estimulación se incrementa. Las diferencias de respuesta de los linfocitos incubados con la fracción 4S de suero humano normal y 4S de suero de gestante desprovisto de AFP, dejan de ser estadísticamente significativas, cuando la concentración protéica añadida es 30 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo. A dicha concentración, el índice de estimulación es muy variable de unos experimentos a otros. Quizás en estas condiciones límite, las subpoblaciones de linfocitos T de los diferentes donantes, estén jugando algún papel en dicho fenómeno. Sin embargo, se produce un efecto altamente reproducible en todos los experimentos, cuando se añaden 240 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo de la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP.

Dada la implacable inhibición observada tras la incubación de linfocitos T con la fracción 4S de suero de mujeres grávidas desprovisto de AFP, se podría pensar que dicha fracción, produjera muerte celular, proporcional a la concentración protéica presente en el cultivo. Es decir que se tratara de una sustancia citolítica. Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad realizados marcando células con ^{51}Cr , revelan que no se trata de una sustancia citotóxica, descartando que el fenómeno de inhibición, se debiera a un efecto citotóxico de esta fracción.

Por otro lado, la depresión de la proliferación celular, podría ser debida a que alguno o algunos componentes de la fracción 4S, formaran complejos mitógeno-proteína, combinándose con la lectina y por lo tanto disminuyendo el número de moléculas de mitógeno libres, capaces de estimular las células. Lo cual se traduciría en una inhibición de la estimulación celular y explicaría en el caso de máxima concentración protéica, unos resultados similares a los controles sin mitógeno. Otro mecanismo de acción podría ser, bien por bloqueo de los receptores celulares para la lectina, o disociando la unión de la lectina a la membrana celular. Sin embargo,

se puede concluir, que tampoco ésta es la causa por la cual, la proliferación celular, queda deprimida en presencia de la fracción 4S de suero de gestantes desprovisto de AFP, ya que el fenómeno de inhibición, se observa también en cultivos mixtos heterólogos de linfocitos, donde la estimulación celular, está mediada por los distintos antígenos de histocompatibilidad presentes en las superficies celulares. Por lo tanto, la fracción 4S de suero de mujeres embarazadas sin AFP, inhibe la estimulación de células T por mecanismos distintos a la unión, interferencia o competición con el mitógeno.

Está claro que la fracción 4S de sueros de gestantes sin AFP, actúa inhibiendo la respuesta proliferativa de linfocitos T. Ahora bien, la población de células T, está compuesta de una serie de subpoblaciones denominadas: linfocitos T cooperadores, T supresores y T citotóxicos. Los factores supresores de la fracción 4S, podrían actuar impidiendo o dificultando la división de las células mediante cambios en la secuencia metabólica necesaria para la proliferación celular, produciendo alteraciones en la sensibilidad al estímulo o en la capacidad de respuesta. Por otro lado, podría tener una acción directa sobre las células T cooperadoras impidiendo su desarrollo o bien estimulando las células T supresoras, las cuales a su vez actuarían sobre las T cooperadoras, inhibiendo la respuesta en los cultivos. Finalmente, podría actuar activando una subpoblación celular, cuyo efecto cooperador sea requerido para la diferenciación y proliferación de una población de células supresoras.

Con objeto de dilucidar, si la fracción 4S, tiene una acción preferente sobre alguna subpoblación de linfocitos T, se realizó un estudio de marcadores de superficie, con anticuerpos monoclonales para linfocitos totales (T3), T cooperadores (T4) y T supresores/citotóxicos (T8), con el fin de objetivar variaciones en los porcentajes de las subpoblaciones.

El estudio cinético, revela que no hay diferencias estadísticamente significativas en cualquiera de las subpoblaciones de linfocitos T, incubadas a diferentes tiempos, con albúmina humana, fracción 4S de suero humano normal o fracción 4S de suero de mujeres embarazadas sin AFP. Este hecho, no descarta la posibilidad de que funcionalmente, las células T supresoras o citotóxicas estuvieran favorecidas o, por el contrario, el ejercicio de los linfocitos T cooperadores estuviera deprimido bajo la influencia de la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP.

Los cocientes $T4/T8$, se mantienen a lo largo de todo el estudio, indicando la posibilidad de que la fracción 4S produjera una alteración proporcional sobre las células T cooperadoras y T supresoras/citotóxicas en su funcionalidad, simultáneamente.

Todos los datos parecen apuntar la existencia en la fracción 4S de sueros de mujeres grávidas desprovistos de AFP, de un factor o factores específicos, capaces de bloquear la estimulación mitogénica y no mitogénica de linfocitos T, ejerciendo sobre ellos un efecto citoestático.

El análisis cuantitativo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, no revela ninguna diferencia en cuanto al contenido protéico entre las fracciones 4S de suero humano normal y suero de gestantes desprovisto de AFP. Las proteínas correspondientes a ésta fracción, tienen pesos moleculares comprendidos entre 68.000 y 23.000 Daltons. Quizás la proteína o molécula responsable de inhibir la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA, eluya en una zona muy próxima a la albúmina, impidiendo su identificación, dado que la concentración de albúmina en dicha fracción es considerable.

El análisis mediante inmunolectroforesis de la fracción 4S de suero de mujeres embarazadas sin AFP, frente a suero anti-humano, revela

dos bandas de precipitación, de movilidades α_1 y β_2 , que no se objetivan en la fracción 4S de suero humano normal.

Con el fin de identificar las proteínas correspondientes a dichas bandas, se enfrentó la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP a antisueros específicos de varias proteínas relacionadas con el embarazo. Las proteínas más características del embarazo son β_1 -glicoproteína y α_2 -glicoproteína. Sin embargo, la inmunodifusión doble bidimensional en agar, no revela ninguna banda de precipitación con dichos antisueros.

Las proteínas correspondientes a las dos bandas de precipitación observadas en la inmunoelectroforesis de la fracción 4S de suero de embarazada sin AFP, no se pueden identificar con α_1 -glicoproteína ácida ni ceruloplasmina, ya que tanto la fracción 4S de sueros de gestantes como suero humano, dan reacción positiva en la inmunodifusión doble bidimensional frente a los respectivos antisueros.

La banda de movilidad α_2 que se visualiza claramente en la inmunoelectroforesis de la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP, corresponde a la α_1 -glicoproteína ácida, como se demuestra en la Figura XXV. Este cambio en su movilidad electroforética, puede ser debido a que durante el embarazo, esta proteína tenga una actividad transportadora de algún elemento que altere su comportamiento electroforético.

La transferrina, se identifica con la banda de movilidad β_2 , en ambos lados de la trinchera. El hecho de que en la fracción del suero de embarazada, dicha proteína aparezca en posición más catódica, que en el suero humano normal, podría ser debido a que durante el embarazo aumenta el transporte de hierro, lo cual podría ocasionar el cambio en su movilidad electroforética.

Concluyendo, la fracción 4S de suero de gestantes sin AFP, difiere

en dos proteínas de la fracción 4S de suero humano normal, las cuales no son identificadas con las proteínas características del embarazo, conocidas y podrían ser las responsables del poderoso efecto inhibitorio de la fracción 4S de sueros de mujeres embarazadas sobre linfocitos T.

Cuando concentraciones mínimas, no inhibitorias de la fracción 4S de suero de mujeres embarazadas desprovisto de AFP, son añadidas al cultivo, simultáneamente con concentraciones de AFP normalmente presentes en el suero de gestantes e incapaces por sí solas de producir inhibición, se observa una potenciación del efecto inhibitorio de la proliferación de linfocitos T. Esta acción cooperadora, sugiere que la AFP, que por sí misma tiene una modesta capacidad supresora, puede jugar un importante papel bajo condiciones fisiológicas, actuando concomitantemente con otros factores inmunoreguladores, bien aumentando concertadamente la actividad de un factor inmunosupresor o simplemente ejerciendo como proteína transportadora de dicho factor.

De la acción sinérgica de los factores implicados (AFP y molécula(s) contenida en la fracción 4S de dichos sueros), se infiere el efecto supresivo observado en cultivos de linfocitos T incubados con sueros de mujeres embarazadas y estimulados con PHA.

La respuesta inmune durante el embarazo, podría ser con mucha probabilidad, consecuencia de un minucioso ajuste en un mecanismo multifactorial, es decir que un mismo grado de regulación final, se obtendría con distintas proporciones de los factores modulantes.

De esta forma, podría ser entendida, la tolerancia de la madre por el feto. El equilibrio y la acción conjunta de componentes fetales

(AFP) y maternos (molécula (s) de la fracción 4S del suero), conducirían a través de una elaborada secuencia de reacciones al no rechazo fetal y por consiguiente a un embarazo satisfactorio.

El desarrollo de técnicas para explorar la naturaleza y la regulación de la respuesta inmune en el área inmediata al embrión, es uno de los más importantes objetivos de la futura Inmunología de la Reproducción. Hasta entonces, permanecerá sin clarificar por completo el aparente fallo de la respuesta inmune materna, que conduce a la prevalencia del feto y como la presión selectiva de la evolución ha persuadido al sistema inmune materno para facilitar la supervivencia de las especies.

6-CONCLUSIONES

- 1- El suero de gestantes, inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos T estimulados con PHA. Dicha inhibición, es independiente de la concentración celular presente en el cultivo.
- 2- La respuesta proliferativa de linfocitos T de mujeres embarazadas estimulados mitogénicamente es análoga a la de los linfocitos T de sujetos normales.
- 3- La presencia de linfocitos B, en cultivos de linfocitos T estimulados con PHA o PWM, no altera la inhibición observada en estos últimos, por lo que el fenómeno de inhibición de la estimulación celular producida por sueros de mujeres gestantes, no está proyectada sobre los linfocitos B
- 4- La alfa-fetoproteína purificada (AFP), inhibe la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA. La concentración media a partir de la cual se produce inhibición, es $712,94 \pm 188,49$ ng/ml de cultivo. A niveles superiores, no existe relación cuantitativa entre concentración de AFP y grado de inhibición celular.
- 5- El índice de estimulación de linfocitos T cultivados con AFP purificada, es mayor que el obtenido con sueros de mujeres gestantes. Siendo la concentración inhibitoria de AFP purificada, muy superior a la presente en dichos sueros.
- 6- La depresión de la estimulación de linfocitos T producida por sueros de mujeres embarazadas, es independiente de su contenido en AFP.
- 7- El suero de gestantes desprovisto de AFP, inhibe la respuesta proliferativa de linfocitos T estimulados con PHA, similarmente al suero de mujeres embarazadas completo.
- 8- Los factores responsables de dicha inhibición, se localizan en la fracción de coeficiente de sedimentación 4S, obteniéndose el máximo grado de inhibición a la concentración de 240µg/ml de cultivo. La respuesta

proliferativa varía inversamente a la concentración protéica de dicha fracción y la supresión no se debe a un efecto citotóxico de la fracción 4S de sueros de mujeres embarazadas desprovisto de AFP.

-9- Durante el embarazo, la α_1 -glicoproteína ácida, cambia su movilidad electroforética a α_2 .

-10-A concentraciones no inhibitorias, la AFP y la fracción 4S de suero de gestantes, actúan sinérgicamente en la inhibición de la estimulación de linfocitos T.

7-BIBLIOGRAFIA

- 1 -PASSMORE R. y ROBSON J.S. 1971. "TRATADO DE ENSEÑANZA INTEGRADA DE LA MEDICINA". Ed. Cientifico Médica.
- 2 -ROITT I.M. 1977. "INMUNOLOGIA ESENCIAL". 3ª ed. Ed. Jims.
- 3 -DEMMAN A.M. 1978. Lymphocyte function and disease. Brith.Med.J. 2:980
- 4 -KATZ H.D. 1977. "IN LYMPHOCYTE DIFFERENTIATION, RECOGNITION AND REGULATION". Acad. Press.(Lond.) Wiley.
- 5 -ROOLANTS G.E. 1977. "IN B AND T CELLS IN INMUNE RECOGNITION". Ed. F. Loor.
- 6 -KLEIN J. 1982. "IMMUNOLOGY THE SCIENCE OF SELF-NONSELF DISCRIMINATION". Ed. Wiley Interscience Publication.
- 7 -WOLF R.L. y ANDREONI J. 1982. Soluble inhibitory factor (SIF) in normal human serum. Cellular Immunol. 67:299.
- 8 -MORETTA L., WEBB S.R., CARLO E.G., LYDYARD P.M. y COOPER M.D. 1979. Functional analysis of two human T cell subpopulation: help and suppression of B cell responses by T cell bearing receptors for IgM or IgG. J.Exp.Med. 146:184.
- 9 -MORETTA L., MINGORI M.C., MORETTA A. y COOPER M.D. 1979. Human T lymphocyte subpopulations: studies of the mechanism by wich T cells bearing Fc-receptors for IgG suppress T-dependent B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. J. Immunol. 122:984.
- 10-MORETTA L., MINGORI M.C., MORETTA A., HAYNESB F. y FAUCI A.S. 1980. "IMMUNOLOGY 80". Ed. M. Fouregeau y J. Dausset. Acad. Press.(Lond.).
- 11-HOOVER R. y LYNCH R.G. 1980. Lymphocyte surface membrane immunoglobulin in myeloma T cell with IgA-Fc receptors are markedly increased in mice with IgA Plasmacytomas. J. Immunol. 125:1.280.
- 12-MESTECKY J., WINCHESTER R.J., HOFFMAN T. y KUNKEL H.G. 1977. Parallel synthesis of immunoglobulins and J chains in pokeweed mitogen-stimulated

- normal cells and in lymphoblastoid cell lines. J.Exp.Med. 145:760.
- 13-BEGER J., YANEVA H., NABARRA B. y CROSNIER J. 1980. La glomérulonéphrite à dépôts mésangianse d'IgA: une cause fréquente d'insuffisance rénale terminale. Nouv.Press.Med. 9:219.
- 14-REINHERZ E.L., KUNG P.G., GOLDSTEIN G. y SCHLOSSMAN S.F. 1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J. Immunol. 123:1.312.
- 15-REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G. y SCHLOSSMAN S.F. 1979. Further characterization of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody. J. Immunol. 123:2.894.
- 16-REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G. y SCHLOSSMAN S.F. 1979. Separation of functional subsets of human T cell by a monoclonal antibody. Proc.Nat. Acad.Sci. 76(8):4.062.
- 17-KUNG P.C., GOLDSTEIN G., REINHERZ E.L. y SCHLOSSMAN S.F. 1979. Monoclonal antibody defining distinctive human T cell surface antigens. Science 206:347.
- 18-REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., LEAVEY R.A. y SCHLOSSMAN S.F. 1980. Discrete stages of human intrathymic differentiation. Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T cell lineage. Proc.Nat. Acad.Sci. (USA) 77:1.588.
- 19-REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G. y SCHLOSSMAN S.F. 1980. A monoclonal antibody reactive with human cytotoxic/suppressor T cells subset previously defined by a heteroantiserum termed TH₂¹. J. Immunol.124:1.301.
- 20-EARLEY D.D., HIGENBERGER J., VAY-BOREAU L., SHEN F.W., GERSHON R.K. y CANTOR H. 1978. Immunoregulatory circuits among T cell sets to exert feed-back inhibition. J.Exp.Med. 147:1.106.
- 21-HIRAHARA F., GOARI I., MATSUZAKI Y., SUMIYOSHI Y. y SHIOJIMA Y. 1980. Cellu

- lar immunity in pregnancy: subpopulation of T lymphocytes bearing Fc receptors for IgG and IgM in pregnant women. Clin.Exp.Immunol. 41:353.
- 22-ALARCON-SEGOVIA D. y RUIZ ARGUELLES A. 1978. Decreased circulating thymus-derived cells with receptors for the Fc portion of immunoglobulin G in systemic lupus erithematosus. J.Clin.Inv. 62:1.390.
- 23-KONTIAINEN S. y FELDMANN M. 1978. Suppressor cell induction in vitro. Target of antigen-specific suppressor factor and its genetic relationships. J.Exp.Med. 147:110.
- 24-FIGHERY C., WELAL C.A., WEIR D.G. y GREALLY J.F. 1978. In vitro studies of suppressor cell function in human peripheral blood mononuclear cells. Clin.Exp.Immunol. 32:459.
- 25-MARX J.L. 1980. Natural killer cells help defend the body. Science 210:624.
- 26-SPRENT J. 1978. Restricted helper function of F_1 hybrid T cells positively selected to heterologous erythrocytes in irradiated parental strain mice. evidence for restrictions affectting helper cell induction and T-B colabo_ ration, both mapping to the k end of the H-2 complex. J.Exp.Med. 147:1.159
- 27-HANSSON M., KIESSLING B., ANDERSSON B., KARRE K. y RODER J.C. 1981. NK cell sensitive T cell subpopulation in thymus: inverse correlation to host KK activity. Nature 278:174.
- 28-PALOMINO M.P. 1980. Subpoblaciones de linfocitos T y B, marcadores de superficie. Allergol. et Immunophatol. 7:21.
- 30-LAYTON J.E., PIKE B.L., BATTYE C. y NOSSAL G.J. 1979. Cloning of B cells positive or negative for surface IgD. Triggering and tolerance in T dependent systems. J.Immunol. 123:702.
- 31-LAYTON J.E., TEALES J.M. y NOSSAL G.J. 1979. Cloning of B cells positive or negative for surface IgD. Triggering and tolerance in the T dependent splenic focus assay. J.Immunol.123:709.

- 32-GELFAND M.C., ELFENBEIN G.C., FRANK M.M. y PAUL W.E. 1974. Ontogenic of B lymphocytes. Relative rates of appearance of lymphocytes, bearing surface immunoglobulin and complement receptors. J.Exp.Med. 139:1.125.
- 33-HUNG O. y Mc.DEVITT M.D. 1977. Current concepts in immunology. Regulation of the immune response by the Major Histocompatibility System. N.Engl.J.Med 303:1.514.
- 34-CALAFONA M.J., TARPLEY J.L., POTIN C. y CHRETIN P.B. 1975. Correlations among cutaneous reactivity to DNCB. PHA induced lymphocyte blastogenesis and peripheral blood E rosettes. Clin.Exp.Immunol. 19:327.
- 35-HORSMANHCIMO M. 1974. Correlation of tuberculin induced lymphocyte transformation with skin test reactivity and clinical manifestations of sarcoi_dosis. Cell.Immunol.10:329.
- 36-MILLER A.E. y LEVIS W.R. 1973. Lymphocyte transformation during dinitro_chlorobencene contact sensitization. J.Clin.Inv. 52:1.925.
- 37-NOWELL P.C. 1960. Phytohemagglutinin: an iniciator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Research. 20:46.
- 38-WEGMANN T.G. y GILL T.J. 1983. "IMMUNOLOGY OF REPRODUCTION". Ed. Oxford University Press.
- 39-HOGARTH P. 1982. "IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF MAMMALIAN REPRODUCTION". Ed. Blakie.
- 40-FAULK W. y TEMPLE A. 1976. Distribution of beta₂-macroglobulin and HLA in Chorionic vill of human placentae. Nature 262:799.
- 41-WHYTE A. y LOKE Y.M. 1979. Antigens of the human trophoblast plasma membrane. Clin.Exp.Immunol. 37:359.
- 42-VIVES J., GELABERT A. y CASTILLO R. 1976. Frecuency of positive sera during last trimester. Tissue Antigens 7:209.
- 43-Mc.INTYRE J.A. y FAULK W.P. 1979. Antigens of human trophoblast: Effect

- of heterologous anti-trophoblast sera on lymphocyte response in vitro. J.Exp.Med. 149:824.
- 44-PAVIA C.S. y STITES D.P. 1979. Humoral and cellular regulation of alloimmu-
nity in pregnancy. J.Immunol. 123:2.194.
- 45-CARTER J., NEWPORT A., KEELER K.D. y DRESSER D.M. 1983. Facs analysis
of changes in T and B lymphocyte populations in the blood, spleen and
lymph nodes of pregnant mice. Immunol. 48:791.
- 46-CARTER J. y DRESSER D.W. 1983. Pregnancy induces a increased in the
number of immunoglobulin secretion cells. Immunol. 49:481.
- 47-STRELKAUKAS A.J., DAVIES I.J. y DRAY S. 1978. Longitudinal studies showing
alteration in the levels and functional response of T and B lymphocytes
in human pregnancy. Clin.Exp.Immunol. 32:531.
- 48-MOORE M.P., SARGENT I.L., TING A. y REDMAN C.W.G. 1983. Maternal cell-
mediated immunity in pregnancy lymphocyte responses of mothers and their
non-pregnant HLA identical sister to paternal HLA. Clin.Exp.Immunol.
54:91.
- 49-GRANBERG CH., HIRNOVENT T. y TOIVANEN P. 1979. Cell mediated lympholysis
by human mathernal and neonatal lymphocytes: mother reactivity against
neonatal cells and vice-versa. J.Immunol. 123:2.563.
- 50-MARONI E.S., DE SOUSA M.A.B. 1973. The lymphoid organs during pregnancy
in the mouse: a comparison between a syngeneic and a allogenic mating.
Cli.Exp.Immunol. 13:107.
- 51-HOLBOROW REEVES.1977. "IMMUNOLOGY IN MEDICINE". Ed. Acad. Press. (Lond).
- 52-O'SULLIVAN M.J., Mc.INTYRE J.A., PRIOR M. WARRINER G. y FAULK W.P. 1982.
Identification of human trophoblast membrane antigens in maternal blood
during pregnancy. Clin.Exp.Immunol. 48:279.
- 53-HSU C.C.S. 1964. Peripheral blood lymphocyte responses to phytohemaggluti-

- nin and pokeweed mitogens during pregnancy. *Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.)* 146:771.
- 54-PURTILO D.T., HALIGREU H.M., YUNIS E.J. 1972. Depressed maternal lymphocyte response to phytohemagglutinin in human pregnancy. *Lancet* 1:769.
- 55-LEIKIN S. 1972. Depressed maternal lymphocyte response to phytohemagglutinin in pregnancy. *Lancet* 2:43.
- 56-CARR M.C., STITES D.P. y FUDENBERG H.H. 1973. Cellular immune aspect of the human fetal-maternal relationship. In vitro response of grvida lymphocyte of phytohemagglutinin. *Cell.immunol.* 8:448.
- 57-BIRKELAND S.A. y KUISTOFEERSEN K. 1977. Cellular immunity blast, transformation and rosette formation of maternal T and B lymphocyte. *Clin.Exp.Immunol.* 30:408.
- 58-RUPPERT B.L. y RICHIE E.R. 1977. Phytohemagglutinin response murine spleen cells during pregnancy and inhibition of normal phytohemagglutinin response by pregnancy or postpartum serum. *Exp.Hematol.* 5:59.
- 59-CAPPELLINI R., BONNARD G.D., COPPOF D., MIGGIANO V., PASINIL M., CURAPI E.S. y PELLIGNI P.A. 1971. Mixed lymphocyte cultures and HLA antigens. Reactivity of young fetuses, newborns and mother at delivery. *Transplant. Proc.* 3:58.
- 60-LAWLER S.D., UKAEGIOFO E.O. y REEVES B.R. 1975. Interaction of mathernal and neonatal cells in mixed lymphocyte cultures. *Lancet* 2:1.185.
- 61-FABRIS N., PIANTENELLI L. y MUZZIOLI G. 1977. Differential efect of pregnancy or gestagens on humoral and cell mediated immunity. *Clin.Exp.Immunol.* 28:306.
- 62-SASAKI K. y ISHIDA N. 1975. Diminished immune response in pregnancy mice. *J.Exp.Med.* 116:391.
- 63-ANDERSSON R.H. y MONROE C.W. 1962. Experimental study of the behavior

- of adult human skin homografts during pregnancy. *An.J.Obstet.Gynecol.* 84:1.096.
- 64-CAMPION P.D. y CURREY H.L. 1972. Cell-mediated immunity in pregnancy. *Lancet* 2:830.
- 65-THONG J.H., STEELER R.W., VINCENT M.M., HENSEN S.A. y BELLANTINI J.A. 1973. Impaired in vitro cell-mediated immunity to rubella virus during pregnancy. *N.Engl.J.Med.* 289:604.
- 66-CLARK D.A., Mc.DERMOTT M.R. y SZEWSZUK M.R. 1980. Impairment of host versus graft reaction in pregnant mice. Selective suppression of cytotoxic T cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy. *Cell.Immunol.* 52:106.
- 67-CHAOUAT G. y VOISIN G.A. 1981. Regulatory T cells in pregnancy. Comparison of early acting and late acting suppressor T cell in MLR: evidence for involvement of differential T cells subset. *Immunology* 44:393.
- 68-HOUILLON C. 1973. "EMBRIOLOGIA" 3ª edic. Ed. Omega.
- 69-DAVID G., y HAEGEL P. 1970. "CUADERNOS PRACTICOS DE EMBRIOLOGIA". 2ª edic. Ed. Toray-Masson.
- 70-WHYTE A. 1978. H.C.G. and trophoblast antigenicity. *Lancet* 2:1003.
- 71-HOLDTOCK G., CHASRENAY B. y KRAWITT E.L. 1982. Effect of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. *Clin.Exp.Immunol.* 47:449.
- 72-SCHIFF R.I., MERCIER D. y BUCKLEY R.H. 1975. Inability of gestational hormones to account for the inhibitory effect of pregnancy plasmas on lymphocyte responses in vitro. *Cell.Immunol.* 20:69.
- 73-PAVIA C., SIITERI P.K., PERLMAN J.D. y STITES D.P. 1979. Suppression of murine allogeneic cell interaction by sex hormones. *J.Reprod.Immunol.* 1:33.
- 74-KASAKURA S. 1973. Is cortisol responsible for inhibition of MLR reaction by pregnancy plasma?. *Nature* 246:496.

- 75-STIMSOM W.H.1980 . Are pregnancy associated serum proteins responsible for the inhibition of lymphocyte transformation by pregnancy serum? Clin.Exp.Immunol. 40:57.
- 76-VAN VLASSELAER P. y VAN DEPUTTE M. 1984. Non suppressive properties of murine trophoblast. Cell.Immunol. 83:422.
- 77-HAN T. 1974. Inhibitory effect of human chorionic gonadotrophin on lymphocyte blastogenic response to mitogen, antigen and allogenic cells. Clin.Exp. Immunol. 18:529.
- 78-SLATER L.M., BOSTICK W. y FLETCHER C. 1977. Decreased mortality of murine graft-versus-host disease by human chorionic gonadotrophin. Transplantation 23:351.
- 79-MAES R.F. y CLAVERIE N. 1977. The effect of preparation of human chorionic gonadotrophin on lymphocyte stimulation and immune response. Immunology 33:351.
- 80-MORSE J.H., STEARNS G., ARDEN J., AGOSTO G.M. y CANFIELD R.E. 1976. The effect of crude and purified human gonadotrophin on in vitro stimulated human lymphocyte cultures. Cell.Immunol. 25:178.
- 81-WERTHAMER S., GOVINDARAJ S., AMARAD L. 1976. Placenta, transcortin and localized immune response. J.Clin.Invest. 57:1.000.
- 82-GALBRAITH G.M.P., GALBRAITH R.M y FAULK W.P. 1980. Transferrin binding by human lymphoblastoid cell lines and other transformed cells. Cell.Immuno 49:215.
- 83-NOONAN F.P., HALLIDAY W.J., MORTON H. y CLUNIE G.J.A. 1979. Early pregnancy factor is immunosuppressive. Nature 278:649.
- 84-STIMSOM W.H. 1972. Transplantation-nature's success. Lancet 1:684.
- 85-STIMSOM W.H. 1976. Studies on the immunosuppressive properties of a pregnancy-associated alfa-macroglobulin. Clin.Exp.Immunol. 25:199.

- 86-MIYANAGA O., OKUBO H. e IRATA Y. 1982. Effect of α_2 -macroglobulin on the lymphocyte response. *Immunology* 47:351.
- 87-STIMSOM W.H. y FARQUHARSON D.M. 1981. Pregnancy associated β_1 -macroglobulin (β_1 -PAM): a new serum protein associated with pregnancy serum derived immune-complexes and ovarian cancer. *J.Clin.Lab.Immunol.* 6:141.
- 88-LIN T.M., HALBERT S.P., KIEFER D. y SPELLACY W.N. 1974. Three pregnancy associated human plasma proteins: purification, monospecific antisera and immunological identification. *Int.Arch.Allergy* 47:35.
- 89-PERSELLIN R.H. y LEIBFARTH J.K. 1978. Studies on the effect of pregnancy serum on polymorphonuclear leucocyte function. *Arth.Rheum.* 21:316.
- 90-BERGSTRAND C.B. y CZAR B. 1956. Demonstration of a new protein fraction in serum from human foetus. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 8:174.
- 91-HALBRECH I. KLIBANSKI C. 1956. Identification of a new normal embryonic haemoglobin. *Nature* 178:794.
- 92-ABELEV G.I. 1971. AFP in oncogenesis and its association with malignant tumors. *Adv.Cancer Research* 14:295.
- 93-MASOPUST J., KITHIER K., RADL J., KOUTECKY J. y KOTAL L. 1968. Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases *Int.J.Cancer* 3:364.
- 94-NISHI S. 1970. Isolation and characterization of human fetal α -globulin from the sera of fetuses and a hepatoma patient. *Cancer Res.* 30:2.507.
- 95-ADINOLFI A., ADINOLFI M. y COHEM S. 1971. Isolation and characterization of a human fetal α -globulin (α_1F) from foetal and hepatoma sera. *Biochem. Biophys. Acta* 251:197.
- 96-ROUSLAHTI E. y SEPPALA M. 1971. Studies of carcinofoetal proteins: physical and chemical properties of human α -fetoprotein. *Int.J.Cancer* 7:218.
- 97-ROUSLAHTI E. y SEPPALA M. 1971. Studies of carcinofoetal proteins. *Develop_*

- ment of a radioimmunoassay for alfa-fetoprotein. Demostration of alfa-fe_
toprotein in serum of healthy human adult. Int.J.Cancer 8:374.
- 98-GILTIN D. y BOESMAN M. 1966. Serum alfa-fetoprotein, albumin and gamma-G-
globulin in the conceptus. J.Clin.Invest. 45:1.826.
- 99-NØGAARD PEDERSEN B. 1976. Human alfa-fetoprotein. Scand.J.Immunol. 4:10.
- 100-PURVES L.R., VAN DER MERWE E. y BERSOHN I. 1970. Variants of alfa-feto_
protein. Lancet 2:464.
- 101-CHARPENTIER B., GUTTMAN R.D., SCHUSTER J. y GOLD P. 1977. Augmentation
of proliferation of human mixed lymphocyte culture by human alfa-fetopro_
tein. J.Immunol. 119:897.
- 102-GOEKEN N.E. y THOMSOM J.S. 1977. Conditions affecting the immunosuppressi_
ve properties of human alfa-fetoprotein. J.Immunol. 119:139.
- 103-YUTAKA A., TUKUSI I. y FUMIHIRO I. 1977. Comparative chemical structures
of human a-fetoprotein from fetal serum and ascites fluid of patient
with hepatoma. Cancer Research 37:3.663.
- 104-HIRAI H., NISHI S. y TSUKADA Y. 1973. Some chemical experimental and
clinical investigations of alfa-fetoprotein. Cancer Research 14:19.
- 105-GITLIN D. y BOESMAN M. 1967. Stites of serum a-fetoprotein synthesis
in the human and in the rat. J.Clin.Invest. 46:1.010.
- 106-FURTH R. y ADINOLFI M. 1969. In vitro synthesis of the foetal a-globulin
in man. Nature 222:1.296.
- 107-GITLIN D. y PERRICELLI A. 1970. Synthesis of serum albumin, prealbumin,
a-fetoprotein, a₁-antitrypsin and transferrin by the human yolk sac.
Nature 228:995.
- 108-GITLIN D., PERRICELLI A. y GITLIN G.M. 1972. Synthesis of a-fetoprotein
by liver, yolk sac and gastrointestinal tract of the human conceptus.
Cancer Research 32:979.

- 109-KEKOMAKI M., SEPPALA M., EHNHOLM C., SCHWARTZ A.L. y RAIVIO K. 1971. Perfusion of isolated human fetal liver, synthesis and release of alpha-fetoprotein and albumin. *Int.J.Cancer* 8:250.
- 110-HABIB Z.A. 1977. Maternal serum alpha-fetoprotein: its value in antenatal diagnosis disease and in obstetrical-gynaecological care. *Acta Obstetr. et Gynecolog.Scand.* 61:14.
- 111-Mc.INTYRE K.R., WLDMANN T.A., MOERTEL C.G. y GO V.L.W. 1975. Serum a-fetoprotein in patients with neoplasms of the gastrointestinal tract. *Cancer Research* 35:991.
- 112-ROUSLAHTI E., SALASPURO M., PIHKO H., ANDERSSON L. y SEPPALA M. 1974. Serum alpha-fetoprotein: Diagnostic significance in the liver disease. *Brith.Med.J.* 2:527.
- 113-WALDMAN T.A. y Mc.INTYRE K.R. 1972. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia telangiectasia. *Lancet* 2:1.112.
- 114-BELANGER L., BELANGER M., PRIVE L., LAROCHELLE J., TREMBLAY M. y AUBIN G. 1973. Tyrosinémie héréditaire et alpha-1-fetoprotein. *Path. et Biol.* 21:449.
- 115-CHANDRA R.K., MADHAVANKUTTY K. y WAY R.C. 1975. Serum a-fetoprotein levels in patients with cystic fibrosis and their parents and sibilgs. *Brith.Med.J.* 1:714.
- 116-ROUSLAHTI E. 1976. Alpha-fetoprotein and serum albumin show sequence homology. *Nature* 260:804.
- 117-LAW S.W. y DUGAICZYK A. 1981. Homology between the primary structure of a-fetoprotein, deduced from a complete c DNA-sequence, and serum albumin. *Nature* 291:201.
- 118-ROUSLAHTI E. y ENGUALL E. 1976. Immunological cross reaction between AFP and albumin. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 73:4.641.

- 119-NUNEZ E., SAVUL L., ENGELMANN F., CRESPIY O., BENSSAYAG C. y JAYLE M.F.
1971. Identification et purification preliminaire de la fetoprotein
liant les oestrogenes dans le serum de rats nouveaunés. C.R.Acad.Sci.
(Paris) 273:242.
- 120-PARMELY M.J. y THOMSOM J.S. 1976. Effect of a-fetoprotein and other
factors derived from hepatoma-bearing rats on the mixed lymphocyte
response. J.Imunol. 117:1.832.
- 121-YACHNIN S. 1976. Demostration of the inhibitory effect of human lymphocy_
tes. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73:2.857.
- 122-MURGITA R.A., ANDERSSON L.C., SHERMAN M.S., BENNICH H. y WIGZELL H.
1978. Effect of human alpha fetoprotein on human B and T lymphocyte
proliferation in vitro. Clin.Exp.Immunol. 33:347.
- 123-DATTWYLER R.J., MURGITA R.A. y TOMASI T.B. 1975. Binding of the AFP
to murine T cells. Nature 256:656.
- 124-YACHNIN S., SOLTANI K. y LESTER E.P. 1980. Further studies on the mecha_
nism of suppression of human lymphocytes tranformation by AFP. J.Allergy
Clin.Immunol. 65(2):127.
- 125-MURGITA R.A. y TOMASI T.B. 1975. Suppression of the immune response
by alpha-fetoprotein. I-The effect of mouse alpha-fetoprotein on the
primary and secondary antibody response. II-The effect of mouse alpha-fé_
toprotein in mixed lymphocyte transformation. J.Exp.Med. 141:269,440.
- 126-SMITH J.A. 1977. Alpha-fetoprotein: a possible factor necessary for
normal development of the embryo. Lancet 1:851.
- 127-MURGITA R.A. 1976. The immunosuppressive role of alpha-fetoprotein
during pregnancy. Scand.J.Immunol. 5:1.003.
- 128-SEPPARD H.W., SELL S., TREFS P. y BAHU R. 1977. Effect of alpha-fetopro_
tein on murine immune response. Studies in mice. J.Immunol. 119:91.

- 129-SELL S., SEPPARD H.W. y POLER M. 1977. Effect of alpha-fetoprotein on murine immune response. Studies on rats. J.Immunol. 119:98.
- 130-MURGITA R.A., GOIDL S., KONTIAINEN S. y WIGZELL H. 1977. Alpha-fetoprotein induces suppressor T cells in vitro. Nature 267:257.
- 131-HASSOUX R., POUPON M.F.,URIEL J. 1978. Lack of inhibition by mouse alpha-fetoprotein (AFP) of in vitro induced lymphocyte blastogenesis. Ann.Immunol. (Inst.Pasteur) 129c:275.
- 132-MURGITA R.A., PECK A.B., WIGZELL H. 1978. Selective immunoregulatory properties of alpha-fetoprotein. Fed.Proc. 37:1.594.
- 133-SOUBIRAN P., MUCCHIELLI A., KERCKAERT J.P., BAYARD B. y MASSEYEFF R. 1979. Stimulatory effect of human alpha-fetoprotein and its molecular variants on in vitro induced lymphocyte blastogenesis. Scand.J.Immunol. 10:179.
- 134-HOOPER D.C., MURGITA R.A. 1981. Regulation of murine T-cell response to autologous antigens by alpha-fetoprotein. Cell. Immunol. 63:417.
- 135-PAGE M. 1973. Purification on Sepharose-linked Concanavalina A. C.J.Bioch. 51:1.213.
- 136-OUCHTERLONY O. 1948. In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. Act.Path.Microb.Scand. 25:186.
- 137-YALOW R.S. y BERSON S.A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J.Clin.Invest. 39:1.157.
- 138-JOHANSSON S.G.O., KJESSLER B. y SHERMAN M.S. 1976. Determination of alpha-fetoprotein by a new paper disc radioimmunoassay of the sandwich type. Int.Archs.Allergy Appl.Immunol. 52:384.
- 139-GREENWOOD F., Hunter W.M. y GLOVER J.S. 1963. Radioimmunoassay method for determination of IgE. Biochem. 89:144.
- 140-LOWRY O.,ROSENBROUGH N.S.,FARR A.L. y RANDALL R.S. 1951.Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 142:265.

- 141-LAEMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage. *Nature (Lond)* 227:680.
- 142-BOYUM A.S. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand.J.Clin.Lab.Invest. (Suppl)* 21:51.
- 143-GALILI U. y SHLESINGER M. 1974. The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells. *J.Immunol.* 112:1.628.
- 144-FAGREUS A. 1950. La correlation entre la reaction reticulo-plasma-cytaire et la formation de anticorps. *Sang.* 21:480.
- 145-BRUNNER K.T., MAUEL J., CEROTTINI J.C. y CHAPUS B. 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells "in vitro"; inhibition by isoantibody and drugs. *Immunology* 14:181.
- 146-FIGUEREDO M.A., PALOMINO M.P., ORTIZ F. 1979. Lymphocyte response to phytohemagglutinin in the presence of serum from pregnant women: correlation with serum levels of alpha-fetoprotein. *Clin.Exp.Immunol.* 37:140.
- 147-WEKSLER M.E. y KUNTZ M.M. 1976. Synergy between human T and B lymphocytes in their response to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen. *Immunology* 31:273.
- 148-GMELIG-MEYLING F., VYTEHAAG A.G.C.M. y BALLIEUX R.E. 1977. Human B cell activation in vitro T cell dependent pokeweed mitogen induced differentiation of blood B lymphocyte. *Cell.Immunol.* 33:156.
- 149-BERGSTRAND C.G. y CZAR B. 1957. Paper electrophoretic study of human fetal serum proteins with demonstration of a new protein fraction. *Scand.J. Clin.Lab.Invest.* 9:277.
- 150-MURGITA R.A., ANDERSSON L.C., ROUSLAHTI E., KIMURA A. y WIGZELL H.

1976. Effect of human and mouse alpha-fetoprotein on immune response. Scand.J.Immunol. 6:731.
- 151-YACHNIN S. y LESTER E. 1976. Inhibition of human lymphocyte transformation by human alpha-fetoprotein (HAFP). Comparison of foetal and hepatoma HAFP and kinetic studies of in vitro immunosuppression. Clin.Exp.Immunol. 26:484.
- 152-MURGITA R.A., GOIDL E.A., KONTIAINEN S., BAVERLEY P.C. y WIGZELL H. 1978. Adult murine T cells activated in vitro by alpha-fetoprotein and naturally occurring T cells in newborn mice. Identity in function and cell surface differentiation antigens. Proc.Nat.Acad.Sci. 75:2.897.
- 153-PECK A.B., MURGITA R.A. y WIGZELL H. 1978. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of alpha-fetoprotein. Alpha-fetoprotein induces suppression of cytotoxic T lymphocyte development. J.Exp.Med. 148:360.
- 154-MURGITA R.A. y WIGZELL H. 1976. The effect of mouse alpha-fetoprotein on T cell-dependent and T cell-independent immune response in vitro. Scand.J.Immunol. 5:1.215.
- 155-ZIMMERMAN E.F., VOORTING-HAWKINS M. y MICHAEL J.G. 1977. Immunosuppression by mouse syalited a-fetoprotein. Nature 265:354.
- 156-LESTER E.P., MILLER B.J. y YACHNIN S. 1976. Human alpha-fetoprotein as a modulador of human lymphocyte transformation: correlalation of biological potency with electrophoretic variants. Proc.Acad.Sci.USA 73:4.645.